



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

Procesamiento de la información táctil: La corteza prefrontal medial como centro de integración sensorial

Tesis Doctoral

Jesús María Martín Cortecero

Dirigida por el Doctor

Ángel Núñez Molina

Madrid, 2017



Facultad de Medicina

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

ANGEL NUÑEZ MOLINA, Catedrático de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA que el presente trabajo titulado “**Procesamiento de la información táctil: La corteza prefrontal medial como centro de integración sensorial**”, ha sido realizado bajo mi dirección por D. Jesús María Martín Cortecero, en el Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia de la Universidad Autónoma de Madrid. Dicho trabajo reúne todos los requisitos científicos y formales para ser defendido como Tesis Doctoral y optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Para que así conste, lo firmo en Madrid a 20 de Junio de 2017

Fdo. Ángel Núñez Molina

*“Tell me and I forget, teach me
and I may remember, involve me
and I learn.”*

Benjamin Franklin

Agradecimientos

Recuerdo el día que llegué al departamento, un 12 de junio de 2012, iba a empezar el trabajo fin de máster bajo la dirección del Dr. Ángel Núñez, desde entonces han pasado 5 años y hoy con la Tesis Doctoral terminada recuerdo muchos momentos buenos y otros un poco más difíciles, pero sobre todo hay una cosa que me ha quedado clara, y es que quiero dedicarme a la electrofisiología. Soy consciente que empieza un camino diferente, donde hacerse un hueco en la ciencia no es fácil, pero no faltará empeño y si lo consigo nunca olvidaré que mi pasión por la electrofisiología empezó en el A39 en el despacho del Dr. Ángel Núñez, y por ello no puedo más que darte las gracias por el pasado y por el futuro.

A mi gran amigo Javi, por haber sido un apoyo incondicional todo este tiempo, en los momentos malos, me has dado ánimo, y en los momentos buenos ha sido un actor imprescindible, compartimos juntos aquellos momentos de nervios y tensión en nuestras respectivas bodas.

A Julia invitada de lujo en el mejor día de mi vida, que además ha sido una compañera extraordinaria siempre dispuesta a ayudar, y a compartir conocimientos.

A Laura y Jose, compañeros y amigos con quienes he aprendido mucho y con quienes debatir, se vuelve una fuente de inspiración.

A César, porque ha sido un gran apoyo, máster en experiencia, siempre aportando buenos consejos y fuente inagotable de conocimiento anatómico.

Al resto de mis amigos y compañeros de la “Burbuja” María, Marta, Marian, Diana, Angélica, Pilar, Mario, Nuría, Yasmina, porque ir a comer se convertía en un momento de distensión, alegría, risas, y celebración dentro y fuera del departamento y eso une muchísimo.

A la Dra. Isabel de Andrés, porque siempre me ha apoyado, y me ha hecho sentir una persona válida, y eso para mí es mucho.

Al Dr. David Fernandez de Sevilla, por disposición a responder dudas y por contribuir a mi formación como electrofisiólogo, al Dr. Washington Buño por haberme permitido disfrutar en primera persona de ese inmenso conocimiento. A los profesores Dr. Carlos Avendaño, Dr. Miguel Garzón, Dra Carmen Cavada, por sus magistrales clases de Anatomía, y al resto de profesores del que han contribuido a mi formación, a la Dra Margarita Rodrigo, Al Dr. Francisco Clascá, al Dr. Pablo Rubio, a la Dra. Lucía Prensa, al Dr. Fernando Reinoso, a todos ellos les debo mi formación académica.

A mi gran compañero de laboratorio A22, Carlos Castejón, quien me ayudo muchísimo en mis comienzos, y fuente inagotable de ideas e incansable trabajador. A Irene por haberme permitido participar en sus experimentos, y al resto de miembros del laboratorio.

A Basilio, Toñi y Maria Eugenia, por su amabilidad a la hora de ayudar con los tan tediosos temas burocráticos.

A Rosa, Begoña, y Gema, que siempre con amabilidad me han ayudado en todo aquello que he necesitado.

A mis padres, y a mis tios que siempre se han sentido orgullosos de mi, y a quienes les debo quien soy.

A mi mujer, Beatriz, el gran amor de mi vida, la que ha aguantado mis momentos de stres, y que me ha dado todo su amor, durante tantos años, sin esperar nada a cambio, incondicional, la que no ha permitido que me rindiese, sin importarle nada más que yo me sintiese bien, por tantos consejos, por haberme ayudado tanto, por todo.

Al ministerio de economía y competitividad, por la financiación aportada para la realización de esta Tesis Doctoral BFU2012-36107, y SAF2016-76462

I. Resumen

Mediante registros unitarios extracelulares y potenciales de campo en ratas anestesiadas se ha estudiado el procesamiento sensorial de estímulos repetitivos o los cambios en los parámetros de estimulación en la corteza somestésica primaria y en la corteza prefrontal medial (CPFm). A lo largo de la vía lemniscal existe una adaptación de las respuestas ante un estímulo repetitivo de las vibrisas. Esta adaptación es especialmente pronunciada en la corteza somestésica tanto en capas 2/3 como en capas 5/6. Este patrón de adaptación de la respuesta presumiblemente ocurre en neuronas piramidales, y no en interneuronas inhibitorias. El incremento de la actividad inhibitoria mediante aplicación de muscimol no altera la adaptación encontrada en la corteza, sin embargo, la aplicación de acetilcolina reduce significativamente la adaptación de la respuesta. Este proceso de adaptación no es exclusivo de la vía lemniscal, observándose también en la CPFm, ante una estimulación repetitiva. Mediante registros de campo se demuestra que la CPFm presenta repuestas a estímulos sensoriales. La inyección de un trazador retrogrado y registros electrofisiológicos se demuestra que en parte esta información sensorial que llega a la CPFm tiene origen en las cortezas sensoriales a través de conexiones cortico-corticales. Los cambios que ocurren en la CPFm ante un cambio repentino de la secuencia de estimulación, o durante la inclusión de un estímulo de diferente modalidad sensorial son mayores que la corteza somestésica primaria. Estos cambios pueden ser modificados por aplicación de eserina, que produce un aumento general de los niveles de acetilcolina en corteza, o por la estimulación eléctrica u optogenética de diferentes áreas de la porción horizontal de la banda diagonal de Broca. En conjunto, estos datos sugieren que la CPFm y su modulación por acetilcolina participan de forma activa en el procesamiento de la información sensorial.

II. Abstract

By means of single unit and field potential recordings performed in anesthetized rats, we have studied sensory processing during repetitive stimulation or changes in the pattern of stimulation in the primary somatosensory cortex and in the medial prefrontal cortex (mPFC). An important sensory response adaptation occurs along the lemniscal pathway when whiskers were stimulated within the physiological whisker movement frequency range (4-12Hz) used by rodents to explore the environment. Response adaptation is especially high in neurons of 2/3 and 5/6 cortical layers of the primary somatosensory cortex. This cortical response adaptation occurs presumably in neurons that show pyramidal response characteristics; on the other hand cells that show interneuron response characteristics does not show response adaptation at these frequencies. The increase of inhibitory activity by muscimol injection does not modify response adaptation of cortical neurons. However, acetylcholine application reduces cortical response adaptation. This response adaptation process is not exclusive to the somatosensory cortex and it can be observed in mPFC by a repetitive stimulation. Through field potentials recordings, we demonstrate that mPFC display sensory responses to sensory stimuli. Using retragrade tracers and electrophysiological recordings we show that sensory information arrives mPFC, at least in part, through cortico-cortical projections from primary sensory cortices. Sensory responses in the mPFC change according to the stimulation history or when whisker stimulation is interfered by application of another stimulus. These sensory plasticity processes are greater than those that take place in somatosensory or auditory cortex. These changes are modified by eserine, usually used to increase overall levels of acetylcholine in the cortex, or by electrical and optogenetic basal forebrain stimulation. In conclusion, these results strongly suggest that mPFC and its modulation by acetylcholine play a key role in the integration of multimodal sensory information.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| I. RESUMEN | I |
| II. ABSTRACT | II |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Homologías entre corteza prefrontal de roedores y primates. | 4 |
| 1.2 Subdivisiones de la corteza prefrontal de la rata | 7 |
| 1.3 Citoarquitectura de la corteza prefrontal de la rata | 8 |
| 1.4 Conectividad anatómica | 10 |
| 1.4.1 Conexiones corticales eferentes de la corteza prefrontal medial | 10 |
| 1.4.2 Conexiones corticales aferentes a la corteza prefrontal medial | 11 |
| 1.4.3 Conexiones tálamo-corticales y cortico talámicas | 15 |
| 1.4.4 Otras conexiones | 17 |
| 1.5 Papel funcional de la corteza prefrontal. | 19 |
| 1.6 Propiedades electrofisiológicas de la corteza prefrontal medial | 20 |
| 1.6.1 Neuronas que disparan de forma regular ("Regular spiking" RS): | 21 |
| 1.6.2 Neuronas que disparan en ráfagas ("intrinsic Bursting" IB) | 22 |
| 1.6.3 interneuronas en la corteza prefrontal | 22 |
| 1.6.4 Oscilaciones corticales | 24 |
| 1.7 Circuito prosencefalo basal-corteza prefrontal en la atención | 25 |
| 1.7.1 Relaciones anatómicas entre el prosencéfalo basal y la corteza prefrontal | 27 |
| 1.7.2 Receptores colinérgicos | 28 |
| 1.7.3 Modulación colinérgica de la corteza prefrontal medial | 32 |
| 1.8 El sistema de vibrisas en los roedores | 36 |
| 1.8.1 Vía Lemniscal | 38 |
| 1.8.2 Vía Lemniscal Dorsal | 39 |
| 1.8.3 Vía Extralemniscal | 39 |
| 1.8.4 Vía Paralemniscal | 39 |
| 1.9 Respuestas táctiles y adaptación | 40 |
| 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 43 |
| 2.1 Objetivos específicos | 45 |
| 3. MATERIALES Y METODOS | 47 |
| 3.1 Animales de experimentación | 49 |
| 3.2 Procedimientos quirúrgicos | 49 |
| 3.3 Perfusión transcárdica | 51 |
| 3.4 Registros electrofisiológicos | 52 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 3.4.1 | Registros Unitarios | 52 |
| 3.4.2 | Registros Electrocuticograficos..... | 52 |
| 3.5 | Procedimientos de estimulación | 54 |
| 3.5.1 | Estimulación sensorial | 54 |
| 3.5.2 | Estimulación eléctrica | 59 |
| 3.5.3 | Estimulación optogenética | 60 |
| 3.6 | Aplicación de Drogas..... | 62 |
| 3.7 | Inyección y revelado del trazador retrogrado | 62 |
| 3.8 | Procesamiento Histológico mediante la Tinción de Nissl | 64 |
| 3.9 | Revelado de la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa | 65 |
| 3.10 | Análisis de los datos electrofisiológicos | 66 |
| 4. | RESULTADOS | 71 |
| 4.1 | Adaptación de la respuesta en la corteza de barriles..... | 73 |
| 4.2 | Adaptación de la respuesta en estructuras subcorticales..... | 81 |
| 4.3 | Modulación colinérgica de la adaptación de la respuesta | 83 |
| 4.4 | Respuestas sensoriales en la corteza prefrontal medial. | 89 |
| 4.5 | Resultados anatómicos..... | 98 |
| 4.6 | La historia de estimulación reciente induce cambios en la corteza prefrontal medial y corteza S1..... | 101 |
| 4.7 | La interferencia sensorial provoca cambios en la respuesta en la corteza prefrontal medial. | 108 |
| 4.8 | La ω -Agatoxina modifica las respuestas de la corteza Prefrontal medial. | 111 |
| 4.9 | La aplicación de eserina induce cambios en las respuestas sensoriales. | 113 |
| 4.10 | La estimulación eléctrica y optogenética de la banda diagonal de broca induce cambios en corteza prefrontal medial..... | 115 |
| 5. | DISCUSIÓN..... | 125 |
| 6. | CONCLUSIONES..... | 141 |
| 7. | ABREVIATURAS | 145 |
| 8. | BIBLIOGRAFÍA..... | 147 |

1. INTRODUCCIÓN

La corteza prefrontal (CPF) de primates y roedores juega un papel crucial en la supervivencia del individuo dotándolo de funciones superiores, como la memoria a corto plazo, la toma de decisiones, el comportamiento dirigido a una meta, así como en la atención y la emoción y movimiento oculomotor (Uylings et al., 2003; Fuster, 2008). Aunque ha habido un intenso debate acerca de si los roedores tienen una CPF homologa a la CPF de los primates, actualmente hay un gran incremento de estudios en la CPF de los roedores, debido por una parte a que se ha demostrado que poseen capacidades cognitivas superiores, como las descritas anteriormente, y por otra parte por el interés clínico en enfermedades como la depresión, la esquizofrenia, los déficits de atención e hiperactividad o las adicciones, que pueden ser estudiadas en modelos animales (Uylings et al., 1990; Preuss, 1995 a y b; Uylings et al., 2003; Fuster, 2008).

La CPF se ha definido como el área de corteza del polo rostral, anterior a la corteza motora y pre-motora del cerebro de mamíferos (Fuster, 2008). Existen enormes diferencias entre especies en el volumen del cerebro, siendo el cerebro de la rata cientos de veces más pequeño que el de macaco y miles de veces más pequeño que el de humanos (Uylings y Van Eden, 1990); estas diferencias en volumen también están acompañadas de una diferenciación evolutiva de áreas corticales y por consiguiente de unas funciones cognitivas más complejas (Preuss, 1995a y b; Groenewegen y Uylings, 2000, Heidebreder y Groenewegen, 2003; Uylings et al., 2003). Una de las dificultades que se presentan de cara a hacer homologías entre CPF de roedores y primates es que la CPF no responde directamente a estímulos sensoriales, y no está conectada con motoneuronas primarias y por tanto, no genera directamente un movimiento concreto, dificultando por tanto, una definición inequívoca basada en un criterio funcional (Groenewegen y Uylings, 2000, Uylings et al., 2003) y es por todo esto que surge el debate de si hay elementos comunes que permitan definir una verdadera CPF en roedores homologa a los primates (Uylings et al., 2003).

1.1 Homologías entre corteza prefrontal de roedores y primates.

Desde un punto de vista histórico, Brodmann en 1909 (traducción de Laurence Garey, 2007) investigador pionero en neuroanatomía comparada, postuló un criterio cito-arquitectónico para definir la CPF; este criterio se basaba en la presencia en humanos y primates de una capa 4 granular, en cortezas rostrales al área motora y pre-motora la cual llamó corteza granular frontal (Brodmann, 1909; Northcutt y Kaas, 1995) y afirmó que la CPF era la única y la esencial característica del cerebro de primates (Brodmann, 1909, Northcutt y Kaas, 1995). Sin embargo, este criterio cito-arquitectónico es menos preciso a la hora de comparar estructuras homólogas entre especies más distantes filogenéticamente. Un ejemplo que utilizan Uylings et al (2003) y que evidencia este problema es que en roedores y primates las cortezas motoras son consideradas homólogas, siendo en la rata una corteza granular y agranular en primates maduros (Preuss, 1995 a y b; Northcutt y Kaas, 1995; Uylings et al., 2003), no obstante, esta cuestión está en debate hoy en día. Más tarde Rose y Woolsey (1948 a y b) abogaron por la utilización de un criterio basado en su conectividad neuronal, definiendo por tanto CPF como aquella área de la corteza que recibe proyecciones del núcleo dorso-medial (DM) del tálamo (Rose y Woolsey, 1948a y b; Groenewegen et al., 1990; Uylings y Van Eden, 1990; Benton, 1991; Preuss, 1995a y b, Heidebreder y Groenewegen, 2003, Uylings et al., 2003).

Hoy en día se utilizan diferentes criterios, que están ampliamente avalados por la comunidad científica para definir áreas homólogas entre especies, atendiendo a su patrón de conexiones específicas y a su densidad, propiedades funcionales, electrofisiológicas comportamentales, presencia específica y distribución de neurotransmisores, el desarrollo embrionario, y su cito-arquitectura, utilizándose aunque se ha sugerido que este último criterio se utilice solo para especies más cercanas filogenéticamente (Uylings et al., 2003). Atendiendo a criterios cito-arquitectónicos se ha visto que la CPF de la rata es similar a la corteza cingular anterior (ACC) de los primates, siendo ambas cortezas, tanto en rata como en primates cortezas agranulares, es decir ausentes de capa IV (área 24, 25, y 32) pero distinta de la corteza dorso-lateral

siendo esta granular en primates. Sin embargo, respecto al patrón de conexiones específicas la CPF se ha definido clásicamente como el área de la porción rostral a la corteza motora y pre-motora que reciben proyecciones del núcleo DM (Rose y Woolsey, 1948a y b; Heidbreder y Groenewegen, 2003; Uylings et al., 2003) aunque hoy en día gracias a técnicas más modernas de trazado neuronal se ha podido comprobar que estas áreas que reciben proyecciones del núcleo DM (Leonard, 1972; Divac et al., 1993; Heidbreder y Groenewegen, 2003;). También reciben proyecciones de otros núcleos del tálamo, como los núcleos intra-laminares, el núcleo anterior y la porción rostral del complejo ventral. Conde et al 1990, mediante estudios con trazadores retrógrados concluyeron que la corteza prefrontal medial (CPFm) de los roedores era más similar a la corteza pre-motora que a la corteza dorso-lateral del primate; sin embargo, otros estudios demuestran que la porción dorsal de la CPFm de la rata, por sus conexiones con el núcleo DM del tálamo, era más similar a la corteza dorso-lateral que a la corteza pre-motora del primate (Figura 1) (Preuss, 1995a y b; Vertes, 2002; Heidbreder y Groenewegen, 2003). Seamans et al., concluyeron en 2008, que la CPFm de la rata, comparte elementos comunes tanto con la corteza dorso-lateral como con la ACC de los primates, obviamente a un nivel muy rudimentario.

La CPF, tanto en la rata como en el primate comparte conexiones con otras áreas corticales como cortezas sensoriales, amígdala, hipocampo o cortezas entorrinal y perirrinal, (Preuss y Goldman-Rakic, 1991; Preuss, 1995a y b; Ongur y Price, 2000; Barbas et al., 2002; Heidbreder y Groenewegen, 2003; Hoover y Vertes, 2007; Bedwell et al., 2015). Es importante destacar también que en ambas especies la CPFm es el área cortical que tiene proyecciones directas con las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal y núcleos del tronco, así como el núcleo noradrenérgico locus coeruleus y núcleos serotoninérgicos del rafe dorsal y medial. (Hajos et al., 1988; Sesack et al., 1989; Hurley et al., 1991; Jodo y Aston-Jones, 1997; Semba y Fibiger, 1992; Jodo et al., 1998; Ongur y Price, 2000; Heidbreder y Groenewegen, 2003; Lu et al., 2012; Zaborszky et al., 2015). En el caso la dopamina, tanto la CPFm de la rata como del primate reciben aferencias desde el área tegmental ventral, aunque es la ACC en la rata y la corteza dorso-lateral en el primate las que reciben

información desde el área tegmental ventral más lateral y de la sustancia negra (Thierry et al., 1973; Deutch, 1993; Williams y Goldman-Rakic, 1998; Heidbreder y Groenewegen, 2003). En conclusión, respecto de la conectividad se puede afirmar que la CPF de los roedores y de los primates comparten importantes similitudes aunque cabe evidenciar que ni las proyecciones anatómicas son tan complejas ni las funciones de la CPF de la rata adquieren la complejidad existente en primates o en humanos (Seamans et al, 2008), si bien partiendo de esta premisa, el estudio de la CPF de la rata puede ser un buen modelo para estudiar la función en general y como modelo de estudio de enfermedades psiquiátricas en particular (Brown y Bowman, 2002), por ello en los siguientes apartados se detallara con más profundidad y en particular la CPFm de la rata.

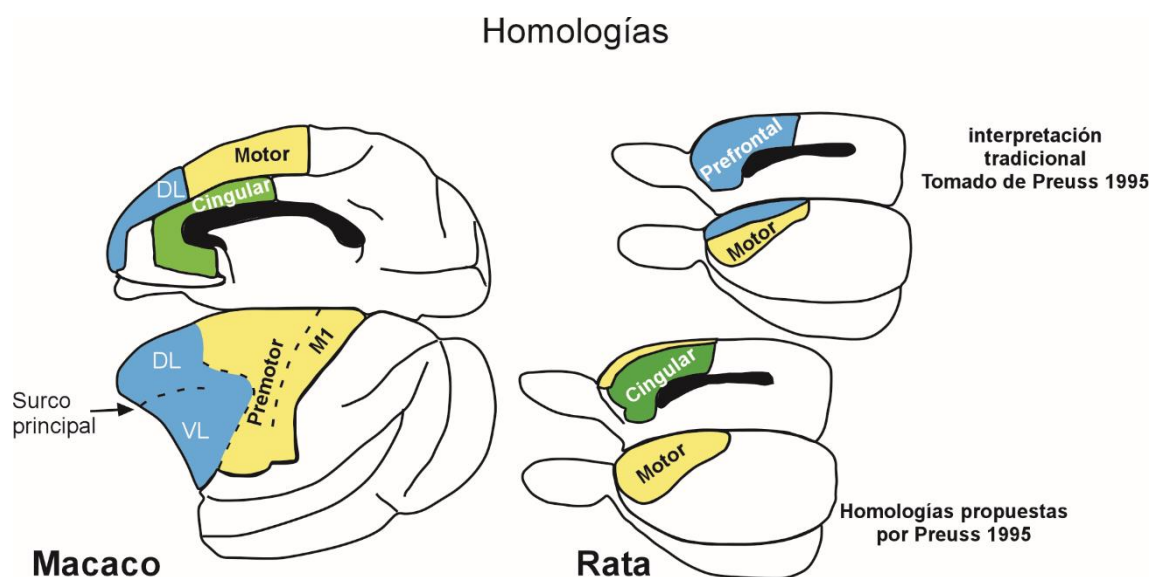


Figura 1, **Esquema anatómico de las homologías en la corteza prefrontal de primates y roedores, Modificado de Preuss, 1995.** DL: Corteza Dorsolateral, M1: corteza motora primaria, VL corteza ventrolateral.

1.2 Subdivisiones de la corteza prefrontal de la rata

En función a la citoarquitectura y conectividad con otras áreas, la CPF de los roedores se puede subdividir en tres subregiones distintas. La primera y localizada más medial, la CPFm, que abarca la mayor parte del muro medial del hemisferio anterior y dorsal a la rodilla del cuerpo calloso. La segunda y localizada más ventral, denominada corteza orbitofrontal, descansa en parte de forma dorsal a la porción más caudal del bulbo olfatorio; y la tercera situada lateralmente, la CPF lateral, también llamada corteza insular, está situada en la rata en la porción anterior del surco rinal (Leonard, 1972; Krettek y Price, 1977; Divac y Mogenson, 1985; Sarter y Markowitsch, 1983 y 1984; Sesack et al., 1989; Conde et al., 1995). En los siguientes apartados nos centraremos con especial detalle en la CPFm ya que es donde se han centrado la mayor parte de los experimentos incluidos en esta Tesis Doctoral (Figura 2).

La CPFm de la rata puede ser subdivida en al menos 4 regiones citoarquitectónicas: el área precentral, corteza agranular medial (AGm) o área Fr2, corteza cingular anterior (ACC; área 24b), el área prelímbica (PL; área 32) y el área Infralímbica (IL; área 25 en los primates) (Van Eden y Uylings, 1985, Gabbott et al., 1997; Uylings y Groenewegen, 2003, Hoover y Vertes, 2007, Fuster, 2008; Vogt y Patxinos, 2014).

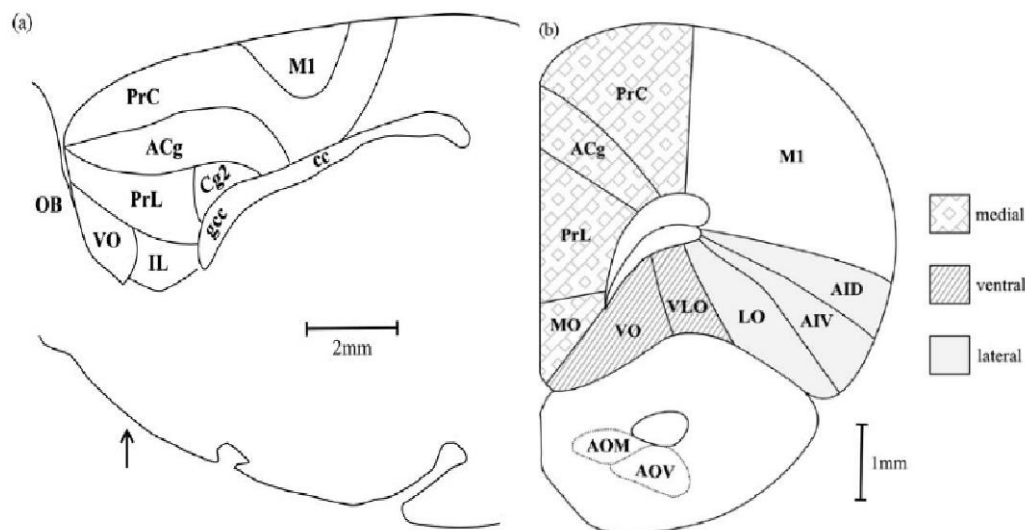


Figura 2. Imagen representativa de las distintas áreas incluidas en la corteza prefrontal medial
Tomado de Dalley et al., 2004. ACg: Corteza cingular anterior, AID insular anterior dorsal, AIV: insular anterior ventral, AOM: núcleo olfatorio anterior parte medial, AOV: núcleo olfatorio anterior parte ventral, Cg2: Corteza cingular área 2, cc: cuerpo calloso, gcc: rodilla del cuerpo calloso, IL: Infralímbica, LO lateral orbital, M1: motora, MO: medial orbital OB: bulbo olfatorio, PrC: precentral, PrL: Prelimbica, VO: ventral orbital, VLO: ventral lateral orbital

1.3 Citoarquitectura de la corteza prefrontal de la rata

Todas las subregiones de la CPFm y orbitofrontal de la rata comparten una característica común, la ausencia de una capa granular (capa IV), esto da lugar una clara diferencia entre la CPF y el resto del neocórtex de la rata. (Van Eden y Uylings, 1985; Heidbreder y Groenewegen, 2003; Uylings et al., 2003). A lo largo del eje dorso-ventral, en la corteza IL, la corteza PL y la ACC anterior va apareciendo una transición gradual en la organización laminar que varía desde corteza de tres capas en el área más ventral, hasta la neocorteza típica de 6 capas en el área más dorsolateral (Van Eden y Uylings, 1985; Gabbott et al., 1997).

La corteza IL tiene una laminación difícilmente observable y con una complicada diferenciación entre capas, con un límite poco claro entre las capas (Van Eden y Uylings, 1985; Gabbott et al., 1997). Las células más superficiales de la capa 2 se extienden hasta la capa 1, por tanto, los límites entre estas dos capas son poco claros. Las capas 2 – 5 contienen células distribuidas

uniformemente, y la diferenciación entre estas capas es complicada incluso en la rata adulta. La capa 6a está separada de la capa 5 por una delgada banda libre de células. La capa 6b es relativamente ancha y contiene las características células pequeñas de esta capa, que se entremezclan con la parte más profunda de la capa 6 (Van Eden y Uylings, 1985; Gabbott et al., 1997).

La corteza PL tiene una laminación más clara que la corteza IL, sin capas entremezcladas y con bordes más definidos. Tiene una capa 2 densa cuyas células no se extienden a capa 1 y una capa 3 amplia cuyas células están menos empaquetadas que en la corteza IL. Además, la capa 3 es de 2 a 3 veces más ancha que la capa 2 y similar en tamaño a la capa 1, la cual es especialmente ancha en la CPF en comparación a otras áreas corticales (Van Eden y Uylings, 1985; Gabbott et al., 1997; Uylings et al., 2003; Gabbott et al., 2005; Van Aerde y Feldmeyer 2015). La transición característica entre la capa 1 a la capa 3 permite una clara diferenciación en la transición de la corteza IL a corteza PL ya que aparecen unos límites fácilmente diferenciables. La capa 5 supone el tercio medio del ancho total de la corteza, no está separada de la 6a por una banda libre de células y no posee las grandes células piramidales típicas que son características de la capa 5 del resto del neocórtex. La capa 6 supone el tercio inferior del total del ancho de la corteza, Además de poseer una diferenciación más clara entre capa 6a y 6b, que permite diferenciar la corteza PL de la IL (Van Eden y Uylings, 1985; Gabbott et al., 1997; Van Aerde y Feldmeyer, 2015).

En la corteza ACC, en general, las células son más pequeñas y sus capas están mucho más diferenciadas que en la corteza PL. La capa 1 de ACC es más delgada que la de la PL y la capa 2/3 contiene células más pequeñas y están más densamente empaquetadas que las de la capa 2/3 de la corteza PL (Van Eden y Uylings, 1985). Las células de capa 5 tiene una forma más parecida a las células piramidales que las que encontramos en capa 5 de corteza PL, además la capa 5 es muy amplia en comparación con la corteza PL. Este cambio repentino del ancho de la capa 5 marca un límite claro entre corteza PL y ACC (Van Eden y Uylings, 1985; Gabbott et al., 1997). En las capas más profundas también hay un marcado cambio de tamaño con respecto

a la corteza PL, siendo la capa 6a y 6b más ancha en ACC que en corteza PL, la célula de capa 6a están empaquetadas más holgadamente y sus células son más pequeñas que en corteza PL, estas características marcan por tanto otro límite entre corteza ACC y corteza PL (Van Eden y Uylings, 1985; Gabbott et al., 1997).

Pandya y Yeterian (1990) demostraron en primates que las conexiones de la CPF con otras áreas corticales son recíprocas y la relación es preferencialmente con áreas citoarquitectónicamente similares. Anatómicamente y con sugerentes consecuencias funcionales, (Barbas et al., 2002) demostraron en primates que las cortezas menos diferenciadas citoarquitectónicamente recibían aferentes de dos o más cortezas de modalidades sensoriales, junto a aferentes de cortezas límbicas; sin embargo, cortezas más diferenciadas, con una capa granular diferenciada, recibían información más específica de aferentes procedentes de solo una o dos modalidades sensoriales y muy escasa información de cortezas límbicas. Aunque estos resultados se demostraron en primates, esta especialización “jerárquica” que demuestran Pandya y Barbas en primates es compatible con los datos disponibles en rata, aunque son necesarios más estudios para confirmarlo (Barbas y Pandya, 1989; Heidebreder y Groenewegen, 2003; Uylings et al., 2003).

1.4 Conectividad anatómica

1.4.1 Conexiones corticales eferentes de la corteza prefrontal medial

Las proyecciones hacia áreas subcorticales desde la CPFm se originan principalmente en capas 5/6 (Douglas y Martin, 2004; Gabbott et al., 2005; Riga et al., 2014). En función de la conectividad, existe una clara diferenciación entre regiones dorsales AgM y ACC, y regiones ventrales, PL e IL (Heidebreder y Groenewegen, 2003; Hoover y Vertes, 2007).

Las cortezas cingular anterior y Fr2 envían proyecciones eferentes hacia cortezas sensorimotoras, visuales y parietales, además de proyecciones a la corteza retrosplenial y con regiones más caudales de la corteza cingular (Reep y Winans. 1982; Sesack et al., 1989; Reep et al., 1990; Bedwell et al., 2014 y 2015).

La corteza PL tiende a llegar a cortezas más dorsales que las proyecciones eferentes de la corteza IL (Room et al., 1985; Sesack et al., 1989; Heidebreder y Groenewegen, 2003), además de densas conexiones intrínsecas. Ventralmente alcanzan la corteza IL, y dorsalmente la corteza ACC, en menor medida la corteza premotora y cortezas ACC; lateralmente también envían proyecciones a la corteza insular agranular principalmente en su porción dorsal, y más caudalmente envía proyecciones a cortezas alrededor del surco rinal, corteza insular posterior, entorrinal y perirrinal. Todas estas conexiones intrínsecas dan una idea de la fuerte comunicación recíproca que hay dentro de la CPFm (Room et al., 1985; Sesack et al., 1989; Heidebreder y Groenewegen, 2003; Bedwell et al., 2014 y 2015).

La corteza IL, envía proyecciones directas tanto en sentido rostral a la corteza orbitomedial como dorsalmente a la corteza PL y en menor medida a la ACC anterior (Room et al., 1985; Hoover y Vertes, 2007). Lateralmente envía proyecciones a la corteza insular agranular principalmente a su porción más ventral, además de enviar densas proyecciones a la corteza entorrinal, corteza piriforme y pocas proyecciones a la perirrinal (Sesack et al., 1989; Hurley et al., 1991; Heidebreder y Groenewegen, 2003; Hoover y Vertes, 2007; Bedwell et al., 2014 y 2015).

1.4.2 Conexiones corticales aferentes a la corteza prefrontal medial

La organización del circuito cortical, y su conectividad se ha estudiado principalmente en cortezas sensoriales, donde los axones procedentes de otras áreas corticales arborizan principalmente en capa 1 y capa 2/3, donde se integra la información y esta es enviada a capa 5/6 las cuales envían

información “driver” y moduladora a estructuras subcorticales, como el tálamo (Sherman y Guillery, 1998; Douglas y Martín, 2004; Dembrow et al., 2010; Feldmeyer, 2012). No obstante, la organización circuital en cortezas agranulares (carentes de capa 4) como la CPF es menos conocida, aunque esta aceptado que esta organización esta conservada a lo largo de las áreas y de las especies (Douglas y Martin, 2004; Van Aerde y Feldmeyer, 2015). Las dendritas de las neuronas piramidales de la capa 2/3, se extienden a través de estas capas, lo que le permiten “muestrear” diversas entradas corticales (Spruston, 2008). Las capas 2/3 de la CPF reciben densas proyecciones cortico-corticales de otras áreas (Douglas y Martin, 2004; Riga et al., 2014) aunque también existen densas proyecciones a capa 5 procedentes otras áreas, principalmente desde otras áreas de la mPFC ipsilateral y contralateral, así como de otras áreas corticales y subcorticales (DeNardo et al., 2015). Otra diferencia importante de la CPF que la hace diferente de otras áreas, es su conectividad recurrente (Wang et al., 2006) y por tanto las neuronas mantienen un disparo persistente que perdura más allá de la presentación del estímulo (Zhang y Séguéla, 2010; Bloem et al., 2014).

Este patrón de conectividad cambia a lo largo del eje dorso-ventral Las distribuciones de proyecciones aferentes a la CPFm son mayoritariamente ipsilaterales, aunque también se han identificado proyecciones desde CPF contralateral (Van Eden et al., 1992; Heidbreder y Groenewegen, 2003; Hoover y Vertes, 2007). Al igual que ocurre en las conexiones eferentes, parece existir un patrón aferente claramente diferenciable entre las áreas más dorsales, y las áreas más ventrales, (Groenewegen, 1988; Van Eden et al., 1992; Conde et al., 1995; Heidbreder y Groenewegen, 2003; Hoover y Vertes, 2007). La región más dorsal recibe proyecciones de diversas áreas de la corteza incluyendo proyecciones de cortezas sensoriales, parietales, y cortezas asociativas; sin embargo, la región más ventral recibe menos proyecciones desde la corteza, destacando principalmente las de cortezas entorrinales y perirrinales (Sesack et al., 1989; Reep y Winans., 1982 y 1990; Van Eden et al., 1992; Conde et al., 1995; Groenewegen y Uylings, 2000; Heidbreder y Groenewegen, 2003; Hoover y Vertes, 2007; Bedwell et al., 2015).

En base a los estudios realizados con trazadores tanto anterógrados como retrógrados se detallan las proyecciones aferentes a las distintas subdivisiones de la CPFm de los roedores.

En la corteza AGm, se han identificado proyecciones aferentes en niveles anteriores, desde el polo frontal medial, corteza orbital medial, y corteza insular dorsal, así como desde corteza orbital medial, ventral orbital, corteza PL y corteza IL mayoritariamente desde el lado ipsilateral a la inyección, aunque también recibe de estas áreas contralaterales (Conde et al., 1995; Heidbreder y Groenewegen, 2003 Hoover y Vertes, 2007). Es importante destacar que en inyecciones de marcador retrogrado, en corteza AGm y ACC anterior, las neuronas marcadas retrógradamente se hayan en todas las capas, mientras que aquellas marcadas en PL e IL, se localizan principalmente en capa 5/6 (Conde et al., 1995; Hoover y Vertes, 2007). Sin embargo, prácticamente hay una ausencia de neuronas marcadas en regiones rostrales de la corteza somestésica primaria y secundaria (Conde et al., 1995; Hoover y Vertes, 2007). A niveles medios del eje antero-posterior, cabe destacar densas proyecciones desde el claustró, la región medial, y posterior de la corteza insular, mientras que existe marcaje moderado, en la corteza somestésica, en corteza cingular y corteza insular granular. A niveles caudales del eje antero-posterior, se encuentra un continuo de neuronas marcadas en corteza retroesplenial, motora, somestésica primaria y secundaria y corteza auditiva, destacando un marcaje muy denso en corteza ectorinal y peririnal, principalmente en capas profundas, además, más caudal a estas regiones, se encuentran proyecciones desde corteza desde la corteza visual secundaria y corteza parietal posterior (Conde et al., 1995; Hoover y Vertes, 2007; Bedwell et al., 2014).

La ACC anterior recibe proyecciones desde otras regiones de la CPFm, prácticamente desde todas las capas, aunque en el caso de la corteza PL e IL, predominan las proyecciones ipsilaterales desde capas profundas. A niveles medios en el eje antero-posterior, se encuentran proyecciones desde la corteza cingular y corteza retroesplenial y motora, y ventro-lateralmente desde el claustró. Más caudalmente se encuentran proyecciones desde la corteza parietal, corteza somestésica secundaria, parietal posterior, corteza ectorrinal y perirrinal. (Conde et al., 1995; Hoover y Vertes 2007)

La corteza PL, recibe proyecciones de buena parte de la CPF, especialmente de otras áreas de la CPFm, concretamente del polo frontal medial, corteza orbital medial, corteza ventral orbital, corteza AGm, así como de cingular anterior, PL e IL ipsilaterales, aunque también se encuentran proyecciones desde corteza PL y orbital contralateral. En niveles medios del eje antero-posterior, se hayan proyecciones desde regiones dorso-mediales de la corteza, corteza cingular y retrosplenial, así como desde regiones ventrolaterales como corteza granular insular y el claustró de la corteza, habiendo una ausencia total de proyecciones desde cortezas motoras primarias, somestésicas y auditivas. En las regiones más caudales de la corteza, hay una reducción dramática de neuronas marcadas retrógradamente, en cortezas retrosplenial, manteniéndose el marcaje en regiones temporales, como en el claustró y en cortezas ectorrinal y perirrinal y corteza entorrinal. (Room et al., 1985; Groenewegen, 1988; Reep et al., 1990; Conde et al., 1995; Heidbreder y Groenewegen, 2003; Hoover y Vertes 2007).

La corteza IL Desde niveles más anteriores recibe proyecciones desde el polo frontal medial, así como de corteza orbital medial, y prelimbica, sin embargo, a niveles más caudales dentro de la CPFm, las proyecciones se restringen casi exclusivamente a la región ventral (PL e IL), y ventrolateralmente a corteza agranular insular y el claustró. A niveles medios en el eje antero-posterior a una importante reducción de proyecciones desde la corteza, restringiéndose a la corteza cingular, extendiéndose caudalmente a la corteza retrosplenial. A niveles más caudales ventrolaterales de la corteza, las proyecciones prácticamente se restringen a cortezas ectorrinal, perirrinal y entorrinal bordeando el surco rinal y dorsalmente, a la corteza retrosplenial (Room et al., 1985; Groenewegen, 1988; Reep et al., 1990; Conde et al., 1995; Heidbreder y Groenewegen, 2003; Hoover y Vertes 2007).

1.4.3 Conexiones tálamo-corticales y cortico talámicas

A diferencia de las cortezas sensoriales, en la CPFm las entradas talámicas llegan principalmente a las capas 3 y 5 ya que carece de capa 4 (Rotaru et al., 2005). Como se comentó anteriormente, las conexiones cortico-talámicas y talamo-corticales han sido importantes para diferenciar áreas corticales, así como su especialización funcional. Rose y Woolsey (1948) definió como CPFm, aquella área cortical que recibía aferentes desde núcleo DM. Posteriormente se comprobó que otros núcleos talámicos proyectaban a la CPF. Las conexiones entre CPF y diferentes núcleos del tálamo son recíprocas y topográficamente organizadas (Groenewegen et al., 1990; Jones, 2007).

En base a estudios realizados con trazador retrogrado y anterógrado, se detallan las conexiones con cada una de las subdivisiones de la CPFm.

La corteza AGm recibe densas proyecciones desde el núcleo paratenial, núcleo reuniens, el complejo ventral-anterior lateral y más caudalmente con el núcleo paraventricular, DM, segmentos más laterales, núcleo antero-medial, núcleo paracentral, núcleo central-lateral, y central-medial, siendo especialmente abundantes en el caso del núcleo DM, núcleo romboide, núcleo reuniens y núcleo ventral-medial (Leonard, 1972; Thierry et al., 1973; Groenewegen, 1988; Conde et al., 1995; Vertes, 2002; Heidbreder y Groenewegen, 2003; Jones, 2007; Alcaraz et al., 2016).

La ACC anterior recibe densas proyecciones desde el núcleo paraventricular, núcleo paratenial, núcleo reuniens, núcleo ventral medial, núcleo DM región medial, núcleo centro-mediano y de prácticamente desde toda la extensión del núcleo anterior medial, más caudalmente, existen abundantes conexiones con el núcleo dorso-medial lateral, núcleo central-lateral, núcleo reuniens, núcleo paracentral y núcleo romboide (Groenewegen, 1988; Groenewegen et al., 1990; Freedman y Cassel, 1991; Vertes, 2002; Jones, 2007).

La corteza PL recibe densas proyecciones desde los núcleos de la línea media, principalmente del segmento medial del núcleo dorsomediano, núcleo paraventricular núcleo reuniens y núcleo romboide, y en menor medida desde

los núcleos central-laterales, y anterior medial (Leonard, 1972; Room et al., 1985; Vertes, 2002; Heidbreder y Groenewegen, 2003; Vertes, 2006; Jones, 2007).

La corteza IL está conectada principalmente con el núcleo paratenial, núcleo paraventricular, núcleo dorsomediano en su segmento medial, núcleo reuniens, y núcleo romboide (Room et al., 1985; Hurley et al., 1991; Van Eden et al., 2000; Vertes, 2002; Heidbreder y Groenewegen, 2003; Jones, 2007).

Las proyecciones tálamo-corticales desde el núcleo DM hacen sinapsis principalmente en la capa 3 mientras que los núcleos intralaminares y núcleos de la línea media, hacen sinapsis principalmente en las capas 5 y 6 de la CPFm; cabe destacar que los núcleos de la línea media proyectan principalmente a zonas ventrales, IL y corteza PL ventral (Heidbreder y Groenewegen, 2003; Jones, 2007), mientras que los núcleos de intralaminares lo hacen principalmente a zonas más dorsales de la CPFm (Jones, 2007). Los núcleos de la línea media parecen estar implicados en aspectos relacionados con el estado alerta y funciones viscerales mientras que los núcleos intralaminares, estarían más relacionados con aspectos relacionados con la orientación y la atención (Krout et al., 2002; Jones, 2007).

Es importante destacar las proyecciones desde la CPF al núcleo reticular talámico, el cual contiene neuronas inhibitorias. Estas conexiones son, desde un punto de vista funcional, muy importantes. El núcleo reticular talámico es una “lamina” de células inhibitorias que rodean en gran parte el tálamo, situándose en el espacio entre la capsula interna y la lámina medular externa del tálamo, siendo atravesado por axones tálamo-corticales y cortico-talámicos, muchos de los cuales dejan colaterales en este núcleo. Se han encontrado proyecciones aferentes desde la corteza IL y desde la ACC anterior de la rata hacia el núcleo reticular talámico (Cornwall et al., 1990; Zikopoulos y Barbas, 2007; Cavdar et al., 2008; Torres-García et al., 2012).

1.4.4 Otras conexiones

Las proyecciones desde el hipocampo a la CPFm se originan principalmente en el subículo y CA1, alcanzando principalmente la CPFm ventral, concretamente la corteza IL y la corteza PL ventral, sin embargo, las conexiones entre CPFm y corteza parahipocampal son bidireccionales. La corteza perrinal proyecta principalmente a corteza IL y corteza PL ventral, las aferencias desde la CPF a corteza entorrinal se originan mayoritariamente desde corteza IL, mientras que las proyecciones hacia la corteza perrinal se originan además desde la región dorsal de la CPFm (Sesack et al., 1989, Bedwell et al., 2015).

La amígdala esta principalmente conectada con regiones ventrales de la CPFm, aunque algunas regiones específicas de la amígdala proyectan también a regiones dorsales (Sarter y Markowitsch, 1983 y 1984; Little y Carter, 2013). También existen conexiones con los ganglios basales (Beckstead, 1979; Berendse et al., 1992; Maurice et al., 1998)

Las proyecciones eferentes desde CPFm a los ganglios basales también tienen una organización topografía que mantiene el gradiente dorso-ventral de la CPFm. Desde regiones más dorsales, la corteza AGm proyecta a regiones más centrales del caudado-putamen, esta región estriatal se le ha relacionado con mecanismos atencionales (Beckstead, 1979; Sesack et al., 1989; Berendse et al., 1992; Maurice et al., 1998; Heidbreder y Groenewegen, 2003; Cheatwood et al., 2003). La ACC proyecta a regiones más mediales y se extiende ventralmente, incluyendo el núcleo accumbens, la corteza PL proyecta a la parte más ventromedial del caudado-putamen, al core y a la periferia del núcleo accumbens. La corteza IL alcanza casi exclusivamente a la periferia del núcleo accumbens (Groenewegen et al., 1990; Ding et al., 2001; Heidbreder y Groenewegen, 2003). Esto indica que principalmente la región ventral de la CPFm, envían proyecciones al núcleo accumbens, un núcleo que se la ha relacionado en mecanismos de recompensa y en procesos de aprendizaje.

La CPFm también envía proyecciones al hipotálamo (Floyd et al., 2001; Heidbreder y Groenewegen, 2003) principalmente desde áreas ventrales,

aunque también hay proyecciones desde corteza insular agranular y corteza orbital, esto dota a la CPF de un papel regular en el comportamiento y también en funciones autonómicas. Estas proyecciones al hipotálamo, guardan una clara topografía en las proyecciones desde distintas áreas de la CPFm, por tanto las regiones más dorsales de la CPFm, proyectan principalmente al hipotálamo posterior, las regiones más ventrales, corteza PL e IL en su porción más rostral, de la CPFm, proyecta al hipotálamo dorso-medial, incluyendo también proyecciones al núcleo paraventricular, al hipotálamo ventro-lateral (Saper, 1985; Fisk y Wyss, 2000; Floyd et al., 2001), e hipotálamo lateral a lo largo de su eje antero-posterior, este área tiene un función muy importante en la iniciación de la conducta de ingesta, y que además contiene neuronas orexinérgicas (Cole et al., 2015). En este elegante estudio, Cole et al (2015) demuestran la implicación de la CPFm y estas neuronas orexinérgicas en la iniciación de la búsqueda de comida dependiente de claves y no dependiente del hambre en donde mediante antagonistas reducen este tipo de conducta patológica y donde la CPFm parece jugar un papel clave en este tipo de trastornos (Cole et al., 2015).

La CPFm también tiene conexiones con diversas estructuras del tronco del encéfalo, y de la medula espinal. Estas conexiones mantienen esta distinción entre CPFm dorsal y ventral. Mientras que las regiones más dorsales están conectadas con el núcleo intermediolateral en la medula espinal, implicado en propiocepción, y percepción del dolor. Las regiones más ventrales conectan con núcleos en el puente que controlan funciones autonómicas. Además, en la sustancia gris periacueductal existe un patrón diferente que guarda el gradiente dorso-ventral de la CPFm, por tanto, las regiones dorsales de la CPFm, están conectadas con las regiones más dorso-laterales de la sustancia gris periacueductal, formación reticular y colículos superiores, mientras que las regiones ventrales de la CPFm, están conectadas con regiones más ventro-laterales en el mesencéfalo (Floyd et al., 2000). Además, como el resto de la corteza recibe proyecciones serotoninérgicas de los núcleos del raphe, noradrenérgicos desde el núcleo locus coeruleus, y dopaminérgicos desde el área tegmental ventral, así como colinérgicos desde el prosencéfalo basal y núcleos colinérgicos del puente (Sato y Fibiger, 1986; Carr y Sesack, 1996;

Heidbreder y Groenewegen, 2003; Dalley et al., 2004; Zaborszky et al., 2013; Bloem et al., 2014).

1.5 Papel funcional de la corteza prefrontal.

La CPFm se ha relacionado en general con funciones como la atención, la memoria a corto plazo, la flexibilidad conductual y la toma de decisión, e incluso la regulación cardíaca de la respuesta condicionada al miedo; sin embargo, numerosos estudios funcionales apuntan cierta heterogeneidad funcional dentro de las distintas áreas de la CPFm (Fryszak y Neafsey, 1994; Heidbreder y Groenewegen, 2003; Dalley et al., 2004; Tabares y Correa, 2006; Fuster, 2008; Kesner et al., 2011).

Mediante estudios de lesiones realizados en diferentes áreas, se han observado cambios en la conducta de los animales. Por ejemplo, lesiones realizadas en las cortezas dorsales, corteza AGm y ACC, disminuye la efectividad de los animales en la realización de tareas secuenciales, o bloquean la expresión de la sensibilización a la cocaína y la concomitante liberación de glutamato en el núcleo acumbens (Pierce et al., 1998). Lesiones con ácido iboténico de regiones rostrales de la corteza cingular reducen la aversión o la percepción desagradable de un estímulo nociceptivo, sin embargo, lesiones en áreas caudales de la ACC interfieren en la conducta motora cuando ocurre un estímulo nociceptivo, pero no en la percepción (Johansen et al., 2001; Heidbreder y Groenewegen, 2003). La región dorsal de la rata también está implicada en procesamiento secuencial (Johansen et al., 2001; Heidbreder y Groenewegen, 2003), y en la organización temporal espacial y de objetos (Heidbreder y Groenewegen, 2003), en la memoria a corto plazo de respuestas conductuales, en el aprendizaje asociativo de respuestas motoras y visuales y en general con aspectos relacionados con la atención (Heidbreder y Groenewegen, 2003; Cassaday et al., 2014).

Lesiones en la región ventral de la CPFm, más concretamente de corteza PL ventral y corteza IL, aumentan los comportamientos relacionados con la

ansiedad (Heidbreder et al., 1996; Heidbreder y Groenewegen, 2003), provocan fallos en la memoria a corto plazo (Ragozzino et al., 1998), disminuye la evitación pasiva, y provoca fallos en la capacidad de cambiar el foco atencional inducido por claves viso-espaciales y deteriora la discriminación visual. (Ragozzino et al., 1998 y 1999a y b). La región ventral de la CPFm parece estar implicada en la flexibilidad en el aprendizaje de nuevas reglas relacionadas con claves espaciales, y en general con la función ejecutiva (Cassaday et al., 2014), además la corteza PL es esencial para la generación de miedos condicionados a estímulos aversivos y la corteza IL está directamente implicada en la extinción de éstos, (DelaTour y Gisquet-Verrier, 1996; Chudasama et al., 2003; Cassaday et al., 2014).

1.6 Propiedades electrofisiológicas de la corteza prefrontal medial

La red neuronal de la CPF, como también ocurre en otras áreas, está compuesta por un 80-90 % de células piramidales excitatorias; sus axones forman grandes vías de salida tanto a otras áreas corticales como extra-corticales (De Felipe et al., 2013).

Las neuronas corticales tienen propiedades electrofisiológicas heterogéneas y suele existir una correlación morfológica (McCormick et al., 1985; de Kock et al. 2007; De Kock y Sakmann, 2008); pese a que ha habido gran cantidad de estudios acerca de dichas propiedades en las cortezas sensoriales de distintas especies, son pocos los realizados en la CPFm.

Existen numerosos estudios, principalmente *in vitro*, que demuestran la existencia de dos grupos principales de neuronas piramidales en función de sus propiedades de disparo: las neuronas que disparan de forma regular, “regular spiking” (RS) y neuronas que disparan en ráfagas “intrinsic bursting” (IB) (McCormick et al., 1985; Connors y Gutnick, 1990). Sin embargo, hay muy pocos estudios *in vivo* que demuestren la existencia de estos tipos de disparo en la CPFm de roedores (Déjenétais et al., 2002; Boudewijns et al., 2013).

1.6.1 Neuronas que disparan de forma regular (*“Regular spiking” RS*):

Estas neuronas, al aplicarles un pulso despolarizante, responden con trenes de potenciales de acción (Connors y Gutnick, 1990, Déjenétais et al., 2002). Estas neuronas se han identificado en capas 2/3 y 5 de CPFm, así como en otras áreas corticales de roedores y del gato (Nuñez et al., 1993). Además, muestran una actividad espontánea menor de 1,3 Hz en ratas registradas *in vivo* (Déjenétais et al., 2002).

Dentro de este tipo de neuronas se ha subdividido a su vez en RS de adaptación lenta, en respuesta a un pulso prolongado despolarizante no muestran una adaptación de la frecuencia de descarga, o de adaptación rápida, suelen responder con un tren de potenciales de acción al inicio de los pulsos despolarizantes y luego adaptan muy rápidamente; además su actividad espontánea es muy baja e incluso nula (McCormick et al 1985; Déjenétais et al., 2002).

Este tipo de células se han identificado en las capas 2/3 y 5/6 de la CPFm, y en otras áreas corticales. Estas neuronas, en capas profundas, tienen morfología piramidal; su dendrita apical llega hasta la capa 1, y las dendritas basales están muy desarrolladas, llegando a alcanzar cerca de los 200 μm tanto en el eje rostro-caudal como en el dorso-ventral. El área de su soma es aproximadamente 300 μm^2 . Las neuronas RS piramidales de la capa 2/3 tienen un soma más pequeño de aproximadamente 240 μm^2 y su campo dendrítico basal abarca la capa 2/3 y en alguna ocasión capa 5, llegando su dendrita apical hasta la capa 1. Este tipo de descarga de potenciales de acción RS también se ha identificado en las neuronas estrelladas (Baranyi et al., 1993 a,b; Déjenétais et al., 2002; Van Aerde y Feldmeyer, 2015).

1.6.2 Neuronas que disparan en ráfagas (*"intrinsic Bursting" IB*)

Estas neuronas disparan un tren de potenciales de acción que consiste en tres a 5 potenciales de acción de amplitud decreciente, pero de duración creciente, que se suceden sobre una envolvente despolarizante. Este tipo de descarga en trenes puede disparar a niveles hiperpolarizantes (Low threshold calcium spikes o LTS) o a niveles despolarizantes (High threshold calcium spikes). Este tipo de disparo en ráfagas puede ser debido a la activación de canales de calcio de tipo T, o tipo L, siendo muy frecuentes en las neuronas talámicas y corticales (McCormick et al., 1985; Connors y gutnick., 1990; Nuñez et al., 1990; Déjenétais et al., 2002; Boudewijns et al., 2013). También este tipo de descarga se ha observado en neuronas de la corteza cingular, áreas motoras, áreas sensoriales, generalmente en capa 4 y 5 y en la capa 5 de la CPFm.

En la CPFm de la rata, mediante estudios *in vivo*, también se han identificado neuronas que disparan ráfagas de potenciales de acción similares a las IB, con la peculiaridad de que son capaces de generar más ráfagas durante el pulso de despolarizante (Baranyi et al., 1993 a y b; Déjenétais et al., 2002). Estas neuronas tienen unas dendritas basales que se extienden tanto en el eje rostro-caudal como dorso-ventral aproximadamente 300 μm , el área de su soma es muy grande alcanzando los 350 μm^2 y su dendrita apical deja ramificaciones tanto en capa 5 y pocas en capa 2/3 y alcanzan la capa 1 en donde dejan un penacho de terminales (Déjenétais et al., 2002).

1.6.3 interneuronas en la corteza prefrontal

La red neuronal en la CPF, como también ocurre en otras áreas corticales, está compuesta por un 10-20% de interneuronas inhibitorias GABAérgicas (Ascoli et al., 2008; De Felipe et al., 2013). Pese a que las interneuronas representan una población minoritaria, sin embargo, desempeña un papel muy importante en el control de la atención y el procesamiento de la información (Kim et al., 2016; Castejon et al., 2016; Castejón y Nuñez, 2016). Primordialmente controlan el

nivel de actividad de las neuronas en todo el cerebro, es decir, si existe una disminución de la actividad de las interneuronas, la excitación se exagera, ocasionando crisis epilépticas y deterioro de numerosas funciones cognitivas (Westbrook, 2013).

Existen numerosos tipos de interneuronas, concretamente se han identificado 5 grupos principales en la corteza cerebral, en función de sus marcadores moleculares: calbindina, somatostatina, parvalbumina (PV), interneuronas expresando el receptor de serotonina, 5HT3a y las que expresan el péptido vasointestinal. Estos cinco grupos pueden ser subdivididos en muchos más atendiendo a la expresión de otros marcadores moleculares, síntesis de enzimas, factores de transcripción, etc. Por ejemplo, las interneuronas somatostatina positivas, pueden co-expresar el neuropeptido Y, calretinina, y por tanto formarían otra subdivisión (De Felipe et al., 2013). Por ejemplo, en el hipocampo de roedores se han identificado 21 subtipos de interneuronas (Gabbott et al., 1997; Klausberger y Somogyi, 2009; De Felipe et al., 2013; Caballero et al., 2014).

Pese a esta gran variedad de interneuronas, las más estudiadas en la CPFm han sido las interneuronas positivas para PV, y las positivas para somatostatina. Ambos tipos han sido relacionados con la memoria de trabajo en la CPFm de roedores (Kim et al., 2016). Las interneuronas PV hacen contactos sinápticos principalmente alrededor del soma y controlan el disparo de las células piramidales, generando una rápida, sincronizada y potente inhibición (Kvitsiani et al., 2013; Hua et al., 2014; Castejon y Nuñez, 2016). Las interneuronas somatostatina positivas, cuyos terminales hacen contacto principalmente en las dendritas de las células piramidales, modulan las entradas que recibe la célula piramidal pero el efecto inhibitorio es más débil, variable y prolongado en el tiempo que la inhibición generada por las neuronas PV (Kvitsiani et al., 2013). En la CPFm de la rata se ha relacionado las interneuronas PV con diversos déficits ejecutivos, cognitivos, con el deterioro del procesamiento de la información y control de la información sensorial, así como la extinción del miedo condicionado, el control de la atención o la generación de la actividad gamma en la corteza, (Sohal et al., 2009; Kim et al., 2016). En tareas donde hay una asignación correcta de la atención existe un

aumento de la potencia de la banda gamma y un acoplamiento de los disparos de las interneuronas PV en fase gamma más potente que cuando no se atiende al estímulo (Vikaas et al., 2009; Kim et al., 2016). Las interneuronas disparan más sincronizadas, lo que conlleva a una disminución de la actividad piramidal y a la creación de breves ventanas de tiempo donde las neuronas piramidales serían más sensibles a la entrada de información (Castejón y Nuñez, 2016).

Las interneuronas PV presentan una morfología anatómica correspondiente principalmente a células en cesto y en candelabro. Las interneuronas en cesto y en candelabro tienen numerosas dendritas que habitualmente sobrepasan la capa cortical donde están localizadas, lo que las permiten obtener información de diversas vías aferentes (Tukker et al., 2013); con esta morfología aparecen las interneuronas PV, aunque también están presentes interneuronas somatostatina positivas y péptido vasointestinal positivas (Hioki et al., 2013; Pfeffer et al., 2013). Las interneuronas PV están conectadas unas con otras, mediante uniones en hendidura o tipo “gap” que permite sincronizar la actividad de varias interneuronas simultáneamente (Hioki et al., 2013). La liberación de GABA en la terminal presináptica de estas interneuronas es iniciado por una cantidad pequeña de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, tipo P y tipo Q; y que pueden ser bloqueados por ω -agatoxina (Toledo-Rodriguez et al., 2004; Hefft and Jonas, 2005; Zaitsev et al., 2007). Estas neuronas se caracterizan por tener tasa de disparo de alta frecuencia, potenciales de acción de corta duración, debido a una rápida repolarización y no presentar adaptación ante pulso despolarizantes de larga duración (McCormick et al., 1985).

1.6.4 Oscilaciones corticales

Al igual que en el resto de áreas corticales, en la CPFm existen oscilaciones lentas que se caracterizan por transiciones de “up-state” y “down-states” que son evidentes en los registros de campo y en los registros EEG, durante el sueño fisiológico, así como en animales anestesiados (Nuñez et al., 1993; Gretenkord et al., 2017). El potencial de membrana de las neuronas

piramidales oscila en estados depolarizados e hiperpolarizados, en los que la generación de potenciales de acción ocurre en los “up-state” (Steriade et al., 1993; Gretenkord et al., 2017), durante estas oscilaciones, existe una sincronización de amplias áreas de la corteza. Además, se ha sugerido que estas sincronizaciones juegan un papel clave en la transmisión de la información, y en la consolidación de la memoria (Johnson et al. 2010). Además, existen otras actividades oscilatorias como los husos de sueño o “spindles”, la actividad beta (15-30Hz), la actividad gamma (30-80Hz) y la actividad rápida gamma (80-150Hz) (Ruiz-Mejías et al., 2011; Gretenkord et al., 2017) que pueden contribuir a la sincronización de las neuronas corticales en diferentes estados. Estudios previos han demostrado que la actividad oscilatoria, generada en la CPFm es diferente de la generada en las cortezas sensoriales y motoras en algunos aspectos. Por ejemplo, existe una potencia mayor en las bandas beta y gamma en la CPFm que en cortezas sensoriales y motoras, esto puede ser debido posiblemente a una mayor frecuencia de disparo de las neuronas piramidales de la CPFm (Ruiz-Mejías et al., 2011; Gretenkord et al., 2017); además existe mayor potencia de estas de las bandas de frecuencia beta y gamma en regiones dorsales de la CPFm que en regiones ventrales, apoyando la heterogeneidad de la CPFm (Gretenkord et al., 2017).

1.7 Circuito prosencefalo basal-corteza prefrontal en la atención

Además de la CPFm, el prosencéfalo basal ha sido ampliamente estudiado por su importancia en el control de los procesos cognitivos. Su deterioro está relacionado con la enfermedad de Alzheimer en la especie humana, enfermedad que cursa con un deterioro cognitivo progresivo, y cuyos principales signos son la pérdida de la memoria y el deterioro del lenguaje (Hodges y Patterson, 1995). En pacientes postmortem se ha evidenciado una pérdida masiva de neuronas en el prosencefalo basal además la actividad de la AChtransferasa está disminuada en neuronas colinérgicas (Lehericy et al., 1993) y un decremento de la afinidad de receptores, menor liberación de ACh, existiendo una correlación importante entre estos déficits colinérgicos, y el

deterioro cognitivo (De Kosky et al, 1992). Otra de las características de los enfermos de Alzheimer es una reducción del volumen cortical en áreas prefrontales y en el prosencéfalo basal (Hodges y Patterson, 1995), lo cual sugiere una importante relación del circuito prosencefalo basal y CPF que subyace en el deterioro cognitivo que evidencian estos pacientes.

Como se detalló en el apartado anterior, las conexiones entre CPFm y el prosencéfalo basal son muy extensas. Existen numerosos estudios que demuestran que la inervación colinérgica de la CPFm está especialmente implicada en la atención. También se ha relacionado este circuito con el trastorno de déficit de atención e hiperactividad, caracterizado por una falta de control, atención alterada, e impulsividad (Sarter y Paolone, 2011). Golmayo et al. (2003) describieron que el prosencéfalo basal recibía información sensorial de las cortezas visuales y somestésicas a través de la CPF. Además, determinaron que existían áreas en la CPF que estaban dedicadas a un tipo de modalidad sensorial diferente a otras áreas prefrontales y que esto permitía que se pudieran facilitar, mediante receptores colinérgicos, determinados estímulos relevantes.

Es importante volver a destacar la relación reciproca que existe entre la CPFm y el prosencefalo basal, a diferencia de otras áreas corticales, como las sensoriales primarias, que reciben entradas colinérgicas directamente desde el prosencefalo basal pero la relación no es reciproca (Zaborszky et al., 2015). La CPFm es la mayor fuente de proyecciones corticales al prosencefalo por tanto la CPFm es la región cortical más importante de aferencias directa a los nucleos colinérgicos del prosencefalo basal y del puente (Zaborszky et al., 1997; Zaborszky et al., 1999; Ongur and Price, 2000; Uylings et al., 2003; Zaborszky et al., 2013; Bloem et al., 2014).

1.7.1 Relaciones anatómicas entre el prosencéfalo basal y la corteza

prefrontal

La CPFm proyecta a los núcleos septales y banda diagonal de Broca, tanto en a su porción vertical como a su porción horizontal, estas proyecciones están organizadas topográficamente (Heidbreder, and Groenewegen 2003). La región más ventral de la CPFm, tanto corteza PL como corteza IL, proyectan al septum y áreas mediales del prosencefalo basal, mientras que las regiones dorsales de la CPFm proyectan más lateralmente a la porción horizontal de la banda diagonal de Broca (HDB) (Gaykema et al., 1991); además recibe proyecciones desde la banda diagonal de Broca y del núcleo basal magnocelular (Chandler et al., 2013).

En cuanto a las proyecciones colinérgicas desde HDB, sus axones proyectan también topográficamente, siendo la región ventral de la CPFm inervada por axones procedentes de neuronas localizadas más medialmente, mientras que las regiones dorsales reciben axones de neuronas localizadas más lateralmente en este núcleo colinérgico (Saper 1985; Heidbreder y Groenewegen, 2003). Recientemente Bloem et al (2014a) han identificado 4 vías a través de las cuales las proyecciones colinérgicas viajan hasta hacer contacto con las neuronas de la CPFm: vía medial, septal, a través de la capsula interna y una vía lateral. Regiones más rostrales del prosencefalo basal, viajan a través de la vía medial, cuyos somas se encuentran en la porción vertical y horizontal de la banda diagonal de Broca, y que viajan paralelas a la superficie pial en una dirección antero-medial, y anterior a la rodilla del cuerpo calloso, donde entran en la corteza orbital por la capa 1 y hacen sinapsis en corteza PL e IL. El origen de la segunda ruta, o ruta septal, se encuentra también en neuronas rostrales del prosencefalo basal, en la región dorsal de HDB. Los axones de estas neuronas viajan a través del septum medial donde se divide en, una rama que se une al fornix y viaja hacia el hipocampo, y otra rama que perfora el cuerpo calloso, entrando a través de capas profundas de la corteza cingular, hace sinapsis en capas superficiales de esta corteza. Los somas de la tercera ruta, se encuentran en neuronas situadas

en regiones caudales de la banda diagonal de Broca, los axones de estas neuronas siguen una dirección dorso-lateral dividiéndose en dos ramas, una rama que sigue la guía de la estría terminal y hace sinapsis en el hipotálamo, y otra rama que continúa a través de la región anterior de la capsula interna y hace sinapsis en todas las capas de la ACC y corteza agranular media. La cuarta ruta, tiene origen en neuronas situadas en las regiones más caudales de la HDB, pálido ventral, y núcleo basal magnocelular, estos axones viajan lateralmente a través de la capsula externa e inervan cortezas parietales, sensoriales, motoras, ACC y AGm, donde se mezclan con las de la segunda y tercera rutas (Bloem et al., 2014a). Esto sugiere una organización topográfica de las conexiones prosencéfalo basal, CPFm, que sugieren aspectos reguladores diferenciales, aunque el aspecto funcional hoy en día es una incógnita.

1.7.2 Receptores colinérgicos

Mediante la aplicación local de diversos agentes farmacológicos ha sido posible demostrar la participación de distintos receptores tanto nicotínicos como muscarínicos en la CPFm de la rata durante procesos de atención (Hahn et al., 2003; Chudasama et al., 2004; Demeter y Sarter, 2013; Howe et al., 2013, Bloem et al., 2014b).

Existen dos tipos de receptores colinérgicos, los receptores muscarínicos (mAChR) y los receptores nicotínicos (nAChR), ambos permiten a la ACh cambiar la actividad eléctrica de las células con las que contacta, y por tanto afectar a procesos intracelulares concretos (McCormick, 1992; Demeter y Sarter, 2013; Bloem et al., 2014). Ambos receptores son distintos en su manera de actuar, los receptores nicotínicos son receptores ionotrópicos pentaméricos y los receptores muscarínicos son receptores metabotrópicos (Gotti y Clementi, 2004). Cuando la ACh se une a los receptores nicotínicos el canal se abre y permite la entrada de una corriente catiónica que despolariza el potencial de membrana de la célula. Sin embargo, los receptores muscarínicos están

acoplados a una proteína G, y por tanto actúa mediante una cascada de reacciones intracelulares. Existen 5 tipos de receptores muscarínicos (M1-M5); en la corteza cerebral se encuentran principalmente los M1, M2, y M4. Los receptores M1, M3 y M5 están asociados a la proteína Gq/11, y los receptores M2 y M4 están asociados a la proteína Gi/o, (Brown, 2010; Bubser et al, 2012; Bloem et al., 2014b). A través de cascadas intracelulares los mAChR afectan al funcionamiento de numerosos canales iónicos que resulta en cambios en las conductancias, principalmente del K^+ y Ca^{2+} ; por lo general los M1 disminuyen la conductancia al K^+ mientras que los M2 y los M4 aumentan la conductancia del K^+ y disminuyen la conductancia del Ca^{2+} . El efecto producido por activación de receptores muscarínicos es lento y de larga duración, comparado con el generado por la activación de receptores nicotínicos, el cual es rápido y de corta duración (Gulledge et al., 2007; Bloem et al., 2014b).

Los receptores nicotínicos son canales iónicos activados por ligando con una estructura pentamérica. Existen 12 subunidades ($\alpha 2$ - $\alpha 10$, y $\beta 2$ - $\beta 4$), por tanto, existen muchos tipos de receptor que pueden ser formados a partir de estas subunidades. En la corteza cerebral existen dos subtipos principalmente: un receptor homopentámero compuesto de 5 subunidades $\alpha 7$ y un receptor heteropentámero, compuesto por 2 subunidades $\alpha 4$, 2 subunidades $\beta 2$ y una quinta subunidad que puede ser $\alpha 4$, $\beta 2$ o $\alpha 5$ (Albuquerque et al., 2009); hablaremos por tanto de $\alpha 4\beta 2^*$ para designar la presencia de una quinta subunidad. Todos los receptores nicotínicos permiten el flujo de iones de Na^+ , K^+ , y Ca^{2+} , provocando una despolarización de la membrana (Gotti et al. 2006). Sin embargo, existen diferencias importantes en cuanto a la conductancia individual de estos iones (Fucile, 2004; Wallace y Bertrand, 2013).

El receptor nicotínico homopentámero $\alpha 7$ es altamente permeable al ion Ca^{2+} , y que la adición de la subunidad $\alpha 5$ al receptor heteropentámero $\alpha 4\beta 2^*$ incrementa substancialmente la conductancia al Ca^{2+} (Fucile, 2004), ya que el receptor heteropentámero $\alpha 4\beta 2$. El receptor $\alpha 4\beta 2$, aunque tiene una baja conductancia al Ca^{2+} , puede inducir una señalización intracelular de Ca^{2+} a través de canales Ca^{2+} activados por voltaje (Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004).

Otra importante diferencia es la afinidad de cada subtipo de receptor nicotínico a la ACh; mientras que el receptor heteropentamérico tiene una afinidad del orden de nanomolar el receptor homopentamérico $\alpha 7$ tiene una afinidad del orden de micromolar (Gotti et al., 2004; Albuquerque et al., 2009), y es por esto que se ha sugerido que los receptores $\alpha 7$ estarían localizados en la sinapsis mientras que los receptores $\alpha 4\beta 2^*$ estarían localizados extrasinápticamente y serían activados por volumen (Bennett et al., 2012).

Como en otras áreas corticales, existen receptores nicotínicos homopentaméricos y heteropentaméricos postsinápticos en las células de la CPFm. En la capa 1 y en el resto de las capas salvo en capa 6, todas las interneuronas presentan receptores nicotínicos, expresando tanto homopentaméricos como heteropentaméricos. En capa 6 las interneuronas expresan principalmente receptores heteropentaméricos. Las células piramidales de capa 2/3 prácticamente no expresan receptores nicotínicos, aunque puede existir modulación colinérgica indirecta a través de interneuronas. Sin embargo, las neuronas piramidales de capa 5 y capa 6 están directamente moduladas por receptores nicotínicos, tanto homopentaméricos y heteropentaméricos (Alkondon et al., 2000; Gullledge et al., 2007; Albuquerque et al., 2009; Bloem et al., 2014b; Verhoog et al., 2016).

Se puede afirmar por tanto que esta distribución heterogénea de receptores nicotínicos parece jugar un papel clave en la modulación funcional de la CPFm de los roedores (Figura 3). Las entradas a capa 5 desde el tálamo están fuertemente moduladas presinápticamente por receptores heteropentaméricos (Bloem et al., 2014 b; Verhoog et al., 2016).

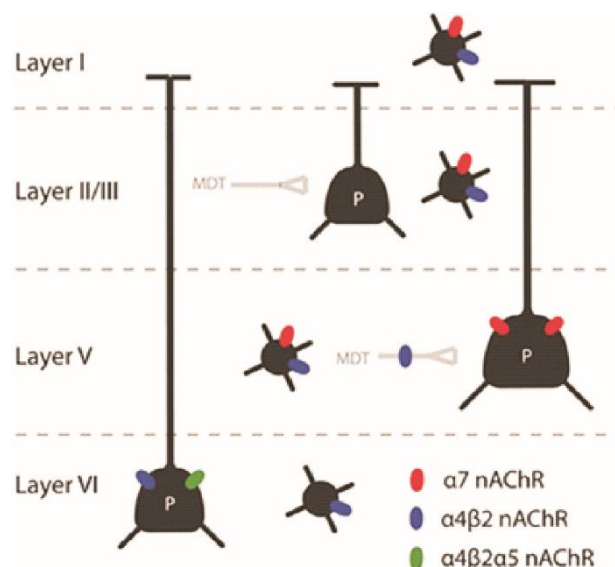


Figura 3. Esquema ilustrativo de la distribución de receptores nicotínicos en la corteza prefrontal medial de la rata, Tomado de Bloem et al., (2014 b). nAChR: Receptor nicotínico, MDT: Terminal del axón tálamo-cortical procedente del núcleo dorso-mediano

La aplicación de ACh en las capas 2/3 producen una inhibición de la respuesta de neuronas piramidales mediadas por activación receptores nicotínicos expresados en interneuronas (Bloem et al., 2014 b; Verhoog et al., 2016). La localización celular de receptores nicotínicos no solo determina la excitabilidad del circuito neuronal, si no a como la plasticidad de sinapsis glutamatérgicas se ven afectadas por las entradas colinérgicas. La activación de receptores nicotínicos en la terminal presináptica puede incrementar la liberación de glutamato (Lambe et al., 2003; Bloem et al., 2014 b; Verhoog et al., 2016), concretamente de los receptores $\alpha 7$, que poseen una alta permeabilidad al Ca^{2+} (Fucile, 2004), pueden inducir potenciación de la sinapsis glutamatérgica en diversas áreas de la corteza (Mansvelder y McGehee, 2000; Griguoli et al., 2013; Verhoog et al., 2016). Sin embargo, en la CPFm, pese a la expresión de receptores nicotínicos $\alpha 7$ en neuronas piramidales de capa 5 y a la modulación de las entradas talámicas mediadas por receptores nicotínicos (Bloem et al., 2014 b; Verhoog et al., 2016), la activación de receptores nicotínicos expresados en interneuronas, aumenta la transmisión sináptica inhibitoria reduciendo las entradas excitatorias, en las dendritas y por tanto suprimiendo la potenciación a largo plazo de las sinapsis glutamatérgicas (Verhoog et al., 2016). En la capa 6 sin embargo los receptores nicotínicos se expresan directamente en neuronas piramidales y por tanto son excitadas directamente

por la aplicación de ACh (Kassam et al., 2008; Bailey et al., 2012; Bloem et al., 2014b; Verhoog et al., 2016). En contraposición a la supresión de la potenciación en capa 5, la expresión postsináptica de receptores nicotínicos, heteropentaméricos en neuronas de capa 6 facilita la potenciación a largo plazo (Verhoog et al., 2016), por tanto, la ACh puede modular la plasticidad de una manera específica en cada capa (Verhoog et al., 2016). La potenciación está facilitada por la liberación endógena de ACh mediante la activación de receptores nicotínicos, aumentando la entrada de Ca^{2+} en las dendritas, favoreciendo la propagación del potencial de acción, mecanismo necesario para la generación de LTP en estas neuronas (Verhoog et al., 2016); sin embargo, en neuronas de capa 2/3 este mecanismo no ocurre y por tanto se suprime la LTP (Verhoog et al., 2016). En capa 2/3 de la CPFm de roedores y de humano las neuronas piramidales expresan escasamente receptores nicotínicos, sin embargo sí que se expresan en interneuronas de capa 2/3 (Albuquerque et al., 2009; Poorthuis et al., 2013; Bloem et al., 2014b; Verhoog et al., 2016), es por esto que el input colinérgico en estas capas aumenta la actividad de las interneuronas (Figura 3), y por tanto aumenta la transmisión sináptica inhibitoria, esto implica por tanto una inhibición de la LTP de las sinapsis glutamatérgicas, fenómeno similar al que ocurre en neuronas de capa 5 (Couey et al., 2007; Verhoog et al., 2016).

1.7.3 Modulación colinérgica de la corteza prefrontal medial

La visión acerca del papel funcional de la ACh como neuromodulador que aumenta el nivel de activación de todo el manto cortical, y que promueve el procesamiento de la información en el animal despierto y durante el sueño REM ha sido ampliamente demostrada, mediante un amplio abanico de estímulos, manipulaciones comportamentales, novedad, estrés, estimulación sensorial, todos ellos aumentan la actividad colinérgica en el cerebro. En los años 90, diversos estudios evaluaron el efecto cognitivo de la lesión del prosencéfalo basal, mediante lesiones y más tarde mediante toxina 192 IgG-Saporina, confirmando el importante papel de esta estructura para una amplia

variedad de funciones atencionales y capacidades (Gill et al., 2000; Chudasama et al., 2004; Dalley et al., 2004; Alenda and Nuñez 2007). La utilización de la inmunotoxina 192 inmunoglobulina G (IgG)-saporina, que destruye específicamente las neuronas colinérgicas, altera significativamente el rendimiento en tareas de atención sostenida cuando se inyecta en el prosencéfalo basal.

El grupo de Martín Sarter demostró que existen incrementos transitorios rápidos de ACh durante pruebas de atención que facilitarían las respuestas a estímulos específicos (Parikh et al., 2007; Howe et al., 2013) y demostraron la importancia de la transmisión colinérgica rápida en los procesos de atención, observando un incremento en la concentración de ACh en tareas que requieren un esfuerzo atencional (Dalley et al., 2004; Parikh et al., 2007), en contra de los criterios tradicionales que consideraban más importante el incremento lento y tónico de los niveles de ACh. Ha habido muchos estudios sobre los efectos tónicos de la ACh, que sugieren la implicación de ACh en procesos de atención mediante el aumento de la excitabilidad de la red neuronal (Picciotto et al., 2012). Sin embargo, tal y como demuestra el grupo de Martin Sarter la ACh no solo estaría modulando los procesos cognitivos mediante una respuesta tónica sino a través de una respuesta fásica. Se han observado incrementos rápidos de la concentración de ACh en la CPFm (en el rango de segundos) en pruebas de atención cuando son detectadas las claves (Parikh et al., 2007; Parikh y Sarter, 2008; Howe et al., 2013), sin embargo, estos incrementos transitorios rápidos están ausentes en la corteza motora en estudios con el animal en movimiento. Por tanto, la ACh se libera en la CPFm en tareas que demandan atención, y se asocia con esfuerzos atencionales y con detección de claves (Parikh et al., 2007; Howe et al., 2013).

Además, a nivel celular se han descrito diferentes efectos de la ACh; por ejemplo, se ha observado repetidamente el efecto facilitador de la ACh de las entradas talámicas a las cortezas sensoriales. Por ejemplo, la ACh aumenta la excitabilidad en las neuronas de capa 4 de la corteza visual, efecto mediado por receptores nicotínicos (Goard y Dan, 2009; Soma et al., 2012). En neuronas de la capa 2/3 esta modulación es más compleja, observándose un aumento de la inhibición GABAérgica porque activan a las interneuronas

inhibitorias (Alitto y Dan, 2013; Bloem et al., 2014 b). Además, se ha sugerido que la ACh reduce el procesamiento lateral desde otras áreas o columnas corticales, esto unido a un aumento de la respuesta a las entradas talámicas, sugieren que la ACh juega un papel muy importante en el incremento de la relación señal/ruido (Hasselmo y Giacomo 2006; Hasselmo y Sarter, 2011). Si bien, aunque los últimos datos se han descritos en cortezas sensoriales el efecto modulador de la ACh en la prefrontal puede ser similar, de hecho, hay razones para pensar que esto sea así, por ejemplo, en el estudio Clarke et al., (1984), los autores no encontraron grandes diferencias en la localización de receptores nicotínicos y muscarínicos entre diferentes áreas corticales, o que las neuronas de capa 5 de la CPFm están moduladas principalmente por receptores muscarínicos M1 (Gulledge et al., 2009), como también se ha descrito por ejemplo en corteza de barriles (Nuñez et al., 2012) en cambio, en neuronas de capa 2/3 y 6 la proyección colinérgica es menor (Houser et al. 1985).

La aplicación de nicotina aumenta la liberación de glutamato en la CPFm y facilita la respuesta neuronal en todas las capas durante la estimulación del núcleo DM (Gioanni et al., 1999). También se ha demostrado que la aplicación de nicotina aumenta la liberación espontánea de glutamato en capa 5 desde los terminales presinápticos procedentes del núcleo DM (Lambe et al., 2003).

Como se comentó anteriormente existe una organización topográfica por el cual diferentes áreas del prosencéfalo basal inervan diferentes áreas de la CPFm (Bloem et al., 2014b), y que selectivamente liberan ACh en capas superficiales o profundas; este hecho unido a la distribución selectiva de receptores muscarínicos o nicotínicos en distintas capas (Bloem et al, 2014b), y una expresión selectiva de receptores nicotínicos dependiente de la capa cortical (Poorthuis et al., 2013 a y b; Bloem et al., 2014 b; Verhoog et al., 2016), parecen revelar que la modulación colinérgica es sumamente específica y precisa en la CPFm de roedores, tratándose por tanto de una relación bidireccional de vital importancia para los procesos cognitivos y comportamentales.

A nivel funcional, esta relación bidireccional entre la CPFm y el prosencéfalo basal puede ser sumamente importante. Varios estudios han demostrado que la estimulación sensorial genera un aumento de la liberación de ACh en esa área, concretamente se ha visto que la estimulación visual causa un aumento en la concentración de ACh en corteza visual mucho mayor que en áreas no visuales (Laplanche et al., 2005). Se ha propuesto que uno de los posibles mecanismos por los cuales puede ocurrir este aumento de la concentración de ACh de manera específica en cortezas sensoriales de mayor demanda, es a través de la CPF, de tal manera que la estimulación de la corteza sensorial activaría primero la corteza sensorial específica, esta a su vez activaría a la CPF, y sería la CPF quien aumentaría la actividad colinérgica del prosencefalo basal (Zaborszky et al., 1997; Sarter et al., 2001). Por tanto, la CPF jugaría un papel importante en este circuito ya que es un área cortical que casi exclusivamente proyecta al prosencefalo basal (Zaborszky et al., 1997; Vertes, 2004) y además anatómicamente recibe información sensorial desde cortezas primarias y secundarias (Conde et al., 1995; Hoover y Vertes, 2007; Bedwell et al., 2014) y electrofisiológicamente existe un aumento de la actividad y de la respuesta a la estimulación sensorial en CPFm (Golmayo et al., 2003). La estimulación de estas genera disparo de potenciales de acción en neuronas del prosencefalo basal (Golmayo et al. 2003; Rasmusson et al., 2007) y por tanto que la inactivación de la CPFm abole la liberación de ACh a demanda de la corteza que esta siendo estimulada (Rasmusson et al., 2007)

Concretamente en la CPFm la ACh parece aumentar la actividad inhibitoria de capas superficiales a la vez que parece existir una facilitación de la información talámica entrante (Verhoog et al., 2016). En otras palabras, existiría una facilitación de la información entrante desde el talámo, a la vez que se inhibiría buena parte de la información cortico-cortical asociacional que entra mayoritariamente a capas superficiales de la CPFm lo que resetearía la red para que la información entrante sea procesada con mayor facilidad; además facilitaría la información saliente de capas 5/6 de la CPFm hacia estructuras subcorticales, como el estriado, afectando por tanto al inicio de la respuesta motora, e influyendo directamente en la ejecución de la respuesta al estímulo. (Sarter et al., 2005; Sarter et al., 2014; Kim et al., 2016; Verhoog et al., 2016).

Aunque el efecto colinérgico en la corteza ha sido ampliamente estudiado, existe un problema añadido para el estudio in vivo, y es que las neuronas colinérgicas del prosencefalo basal, pueden co-expresan el transportador de GABA, y por tanto co-liberar ACh y GABA (Saunders et al., 2015). Aunque el papel fisiológico de esta co-liberación no ha sido esclarecido es muy probable que esta co-liberación de GABA tenga una importante influencia en el comportamiento y en el procesamiento de información, dificultando por tanto la interpretación de los resultados, ya que, si se lesionan estas neuronas colinérgicas puede existir una reducción de ambos neurotransmisores, al igual que para la estimulación habría un aumento de ambos.

A raíz de los datos comentados anteriormente sería esperable que la CPFm reciba información sensorial para poder llevar a cabo estas funciones tan específicas, concretamente de las cortezas somatosensoriales dada la importancia que representa para la supervivencia de los roedores.

A continuación, se describirá el sistema somatosensorial de las vibrisas de los roedores ya que es un sistema en el que se centra buena parte de la presente Tesis Doctoral.

1.8 El sistema de vibrisas en los roedores

El sistema sensorial de las vibrisas tiene características comunes al resto del sistema somatosensorial excepto porque existe una serie de peculiaridades que reflejan la importancia de este sistema sensorial para los roedores. Las ratas y otros roedores poseen unos pelos rígidos especializados en la función táctil, vibrisas, que les proporciona información táctil del entorno, vibración, rugosidad, etc.

Las vibrisas de cada lado de la cara de la rata se disponen dorso-ventralmente en 5 filas horizontales. El folículo de la vibrisa está compuesto por capas de membranas dispuestas concéntricamente. La inervación nerviosa de las vibrisa procede de dos nervios; uno conocido como nervio de la vibrisa superficial (SVN) y el nervio profundo de la vibrisa (DVN). Aproximadamente 5/6 de los

axones que inervan un folículo individual son transportados por el nervio profundo DVN y en torno a 1/6 de los axones son transportados por el nervio superficial SVN. El nervio SVN inerva el área superior de la vibrisa. El movimiento de las vibrisas activa mecanorreceptores localizados en la base del folículo; cada folículo está inervado por 50 – 200 axones procedentes de neuronas del ganglio trigémino (Lee y Woolsey, 1975). En el folículo encontramos multitud de receptores, como los mecanorreceptores de Ruffini, Merkel, terminaciones libres; un axón procedente del ganglio trigémino se especializa en un solo receptor.

Dentro del ganglio trigémino las representaciones de las vibrisas están topográficamente distribuidas, aunque no siguen un orden concreto (Erzurumlu, 2010). El ganglio trigémino proyecta a los diferentes núcleos del trigémino, los cuales se disponen en paralelo, a través de la rama infraorbitaria del ganglio trigémino.

Las neuronas con un mismo campo receptivo se organizan en grupos neuronales específicos, con representación topográfica de cada vibrisa a lo largo de toda la vía somatosensorial. Esta representación topográfica específica se origina en el complejo trigeminal, donde se encuentran agrupaciones neuronales que responden a una misma vibrisa y que denominamos barriletes, cuyos axones proyectan al tálamo, donde forman otros grupos de neuronas que llamamos barriloides. En la corteza cerebral las terminaciones talámicas sobre la capa 4 son tan densas que forman unas agrupaciones que denominamos barriles y que da nombre a esta zona especializada de la corteza somestésica y que conocemos como corteza de barriles (Van der Loos, 1976; Pouchelon et al., 2012, Feldmeyer, 2012).

Es importante destacar la retroalimentación que forma el núcleo trigémino espinal interpolar y el trigémino principal. El núcleo trigémino espinal interpolar forma sinapsis inhibitorias sobre el trigémino principal probablemente para acentuar el contraste entre el centro y la periferia del campo receptivo. El núcleo principal del trigémino y el núcleo espinal interpolar caudal poseen una organización somatotópica precisa de cada vibrisa.

La información táctil recogida por las vibrisas se transmite por el sistema somatosensorial mediante cuatro vías distintas hacia la corteza cerebral (Figura 4), cada uno de ellos lleva un tipo diferente de información (Deschênes et al., 2003; Pouchelon et al. 2012).

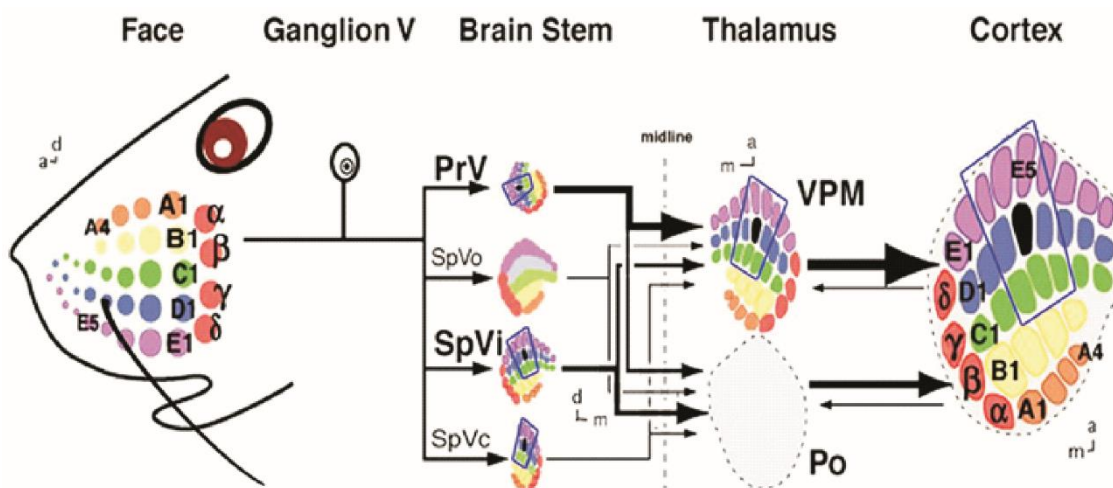


Figura 4. Resumen de vías ascendentes desde la vibrisa a la corteza de barriles. Po: Núcleo posterior del tálamo, PrV: Núcleo principal del trigémino, SpVo: Núcleo espinal oral, SpVi: núcleo espinal interpolar, SpVc núcleo espinal cadudal, VPM: Núcleo Ventral postero-medial (Tomado de Mosconi, 2010).

1.8.1 Vía Lemniscal

Es la vía más importante para la localización del estímulo y determinar sus características físicas. Se origina en las neuronas en la parte ventral del núcleo principal del trigémino (PrV), forman barriletes cuyos axones proyectan con neuronas específicas de la porción dorso-central o “core” del núcleo ventral postero-medial (VPM), en donde se encuentran los barreloides. Las neuronas talámicas que se encuentran en los barreloides proyectan a las capas 4 (barriles) y a las capas 5b y 6 (Koralek et al., 1988; Pouchelon et al., 2012, Feldmeyer, 2012). La representación somatotópica de las vibrisas en esta vía es muy estricta y precisa. Responden con una latencia corta al movimiento de las vibrisas correspondientes, proporcionando una gran resolución temporal y

espacial fundamental para discriminar texturas (Arabzadeh et al., 2005). La porción dorsal del PrV, que no responde a vibrisas, también proyecta a través de la vía lemniscal al VPM, aunque a la porción medial-ventral.

1.8.2 Vía Lemniscal Dorsal

Aunque la mayoría de las neuronas del PrV proyectan al VPM a través de la vía lemniscal, una subpoblación distinta de neuronas, que no forman barriletes, interbarriletes, y que responden a múltiples vibrisas, proyectan a la “cabeza” de los barriloides del VPM, casi al límite con el núcleo posterior medial (POm) que a su vez proyecta a los interbarriles o septa de la capa IV de la corteza somatosensorial (Alloway, 2008). Se considera que esta vía puede estar implicada en la coordinación sensorio-motora (Urbain y Deschênes, 2007).

1.8.3 Vía Extralemniscal

Se origina en las neuronas localizadas en porción interpolar caudal del trigémino espinal, proyecta a los barreloides de VPM ventral que a su vez proyecta de manera difusa a las capas 2, 4 y 6 de la corteza SI, y más focalmente en capas 4 y 5 de la corteza SII (Pierret et al., 2000). Esta vía lleva información dolorosa.

1.8.4 Vía Paralemniscal

Nace de las neuronas situadas en la porción rostral del núcleo interpolar del trigémino espinal; su organización somatotópica es menos precisa. Conecta con el núcleo POm y deja colaterales en diversos núcleos, como el estriado, zona incerta y también proyecta a la capa 1 y capa 5 de la corteza SI, SII, y M1;

puede estar implicada en la regulación sensorimotora de las vibrisas (Pouchelon et al., 2012, Feldmeyer, 2012).

Finalmente, el núcleo oral del trigémino espinal, situado entre los barriletes del PrV y la porción rostral del trigémino espinal interpolar, proyecta al colículo superior, y la porción caudo-ventral del POm, se piensa que puede estar relacionado con la reacción emocional (Pouchelon et al., 2012, Feldmeyer, 2012).

En las cortezas sensoriales las aferencias talámicas entran a la corteza y hacen diana en capa 4 (Douglas y Martin, 2004, Feldmeyer, 2012). Las neuronas excitadoras de capa 4 envían proyecciones a capas supragranulares 2/3, estas a su vez envían información a capa 5 (Gilbert y Wiesel, 1979; Thomson y Bannister, 2003). La capa 5 a su vez inerva la capa 6 y está, envía información a capas superficiales, y también a estructuras subcorticales como el tálamo y los ganglios basales (Gabbott et al., 2005; Olsen et al., 2012); por tanto, a veces las capas 5/6 son llamadas capas corticales de salida, en contraposición a las capas 2/3 que proyectan y reciben principalmente de otras áreas corticales (Douglas y Martin, 2004). Por último, la capa 1 es muy diferente del resto de capas corticales, ya que la densidad de somas neuronales es muy baja, y corresponden exclusivamente a interneuronas GABAérgicas (Mayer et al., 2010). Se ha sugerido que la información “*feedback*” del tálamo es enviada a capa 1, y modula el procesamiento de la columna cortical (Rubio-Garrido et al., 2009; Castejon et al. 2016).

1.9 Respuestas táctiles y adaptación

El sistema somatosensorial de las vibrisas está organizado funcionalmente mediante neuronas que están localizadas en los barriletes, barreloides, o barriles corticales que responden con una latencia corta ante la estimulación de una única vibrisa (la vibrisa principal; Fox, 2002). Sin embargo, si se realizan

registros intracelulares en la corteza de barriles se observa que cada neurona de una misma columna cortical desde la capa 2 hasta la capa 6 presentan respuestas sinápticas a más de una vibrisa adyacentes a la vibrisa principal (Manns et al., 2004), indicando que el campo receptivo de estas neuronas es más amplio. Igualmente, manipulaciones de las entradas periféricas, por ejemplo, anestesia de parte del campo receptivo, también desenmascaran campos receptivos más grandes de lo que las neuronas expresan normalmente (Panetsos et al. 1995). Esto indica que todo el sistema somatosensorial tiene capacidad de modular su respuesta dependiendo del contexto (Jacob et al., 2008).

También se ha demostrado mediante estudios in vivo que existe disminución de la respuesta en cortezas somatosensorial cuando se presentan simultáneamente dos estímulos (Alenda y Nuñez 2004).

Igualmente, la adaptación de las respuestas es una forma de aprendizaje no asociativo que se caracteriza por un decremento de la respuesta cuando un estímulo inicialmente novedoso se presenta repetidamente. Numerosos estudios han aparecido en la última década explorando el fenómeno que hoy conocemos como adaptación específica al estímulo el cual consiste en la habilidad de algunas neuronas para reducir su respuesta ante la presencia de un estímulo repetido. Este mecanismo permite al animal atender a estímulos novedosos que requieren la atención del sistema e ignorar aquellos que ya no son novedosos o contextualmente irrelevantes (Cohen et al., 1997). A diferencia de la fatiga, la adaptación puede darse a intervalos largos entre estímulos, de baja intensidad y es un fenómeno muy sensible a la frecuencia de estimulación; por lo general aumenta al aumentar la frecuencia de estimulación (Lee y Whitsel, 1992). Este mecanismo es común a todas las respuestas sensoriales corticales (Chung et al., 2002) y tiene gran importancia en la percepción de los estímulos. La duración de la adaptación depende del estímulo. Estimulaciones breves provocan una recuperación de la adaptación rápida. Este efecto se debe, en parte, a la depresión sináptica de la proyección tálamo-cortical (Chung et al., 2002).

Aunque la adaptación ocurre en múltiples estaciones de relevo de la vía, la adaptación que se produce en la corteza es más pronunciada y más específica

que la que se produce en núcleos subcorticales de la vía. Algunos mecanismos como el aumento de la inhibición o depresión de las entradas excitatorias han sido propuestos como mecanismos que influyen en la adaptación de la respuesta neuronal a un estímulo repetitivo. Experimentos *in vivo* han descartado la hipótesis del incremento de la inhibición dado que la aplicación iontoforética de antagonistas de los receptores GABA_A, no bloquean la adaptación, ni la inyección intracortical de muscimol (agonista selectivo de los receptores GABA_A) aumentan la adaptación (Nelson, 1991).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El procesamiento sensorial se produce en diferentes áreas corticales y cada uno de ellas, se especializa en el análisis de determinadas características del estímulo como es la corteza de barriles. La CPFm recibe información sensorial de estas áreas primarias y elabora respuestas más complejas ante los estímulos que lo que se produce en áreas sensoriales primarias. Sin embargo, no hay literatura referente a las respuestas sensoriales en la CPFm mediante estimulación mecánica de la vibrisa en roedores.

La presente Tesis Doctoral quiere demostrar el papel que realiza la CPFm en el procesamiento de la información sensorial y su comparación con lo que ocurre en la corteza S1 cuando los estímulos sensoriales se producen en diferentes condiciones de estimulación (adaptación, distracción, novedad) y la influencia que tiene la estimulación simultánea de otras modalidades sensoriales en las respuestas de estas áreas corticales, en la rata anestesiada. Además, como la ACh es uno de los más importantes moduladores de las respuestas corticales en la CPFm, se estudiará su influencia en el procesamiento sensorial en esta corteza.

2.1 Objetivos específicos

- 1- Determinar las características de las respuestas de las neuronas de la corteza somestésica primaria, ante los cambios de los parámetros de estimulación. Lo que conlleva:
 - 1.a Estudiar la adaptación de la respuesta en neuronas de la corteza de barriles tanto de capas 2/3 como de capas 5/6.
 - 1.b Estudiar la adaptación de la respuesta de las neuronas del núcleo ventral postero-medial del tálamo.
 - 1.c Estudiar la adaptación de la respuesta de las neuronas del núcleo principal del trigémino.

- 1.d Estudiar la modulación colinérgica de la adaptación de la respuesta de las neuronas de la corteza de barriles tanto en capas 2/3 como en capas 5/6.
- 2- Determinar si existen respuestas sensoriales en la CPFm por estimulación de las vibrisas y determinar donde se produce el procesamiento sensorial de los estímulos somestésicos y auditivos.
- 3- Determinar electrofisiológicamente y corroborar anatómicamente la fuente de información somestésica hacia la CPFm.
- 4- Determinar si los cambios en los parámetros de estimulación de las vibrisas, distracción y cambios en la secuencia de estimulación, provocan cambios en las cortezas S1 y en la CPFm.
- 5- Determinar si existe adaptación de la respuesta táctil en la CPFm.
- 6- Determinar si la modulación colinérgica de la respuesta somestésica en la CPFm, produce cambios en el proceso de interferencia sensorial.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Animales de experimentación

Se utilizaron 227 ratas adultas de la raza Sprague Dawley de ambos sexos; estos animales fueron obtenidos y estabulados en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, de un peso entre 250-310 gramos, siguiendo los criterios de peso establecido por Paxinos y Watson para la toma correcta de referencias estereotáxicas descritas en su atlas anatómico de rata adulta (Paxinos y Watson 2007). Hasta el día del procedimiento el animal tuvo acceso al agua y la comida “ad libitum”. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la normativa de la Unión Europea (European Communities Council Directive, 2010/63) y de la Universidad Autónoma de Madrid, se emplearon todos los esfuerzos para reducir el número de animales empleados, así como para minimizar el dolor producido por el procedimiento.

3.2 Procedimientos quirúrgicos

Para los experimentos electrofisiológicos las ratas fueron anestesiadas con uretano (1,6 kg/Kg) mediante inyección intraperitoneal. Se administró lidocaína (Xilonibsa 2%) en todas las incisiones y se añadieron dosis suplementarias de anestésico (0,5 g/Kg) intraperitonealmente, cuando se detectaron signos de dolor, reflejos, o cuando el electrocortigrama mostró un aumento de frecuencias rápidas, superiores a la banda delta (0-4 Hz). Para los experimentos de trazado retrogrado neuronal, las ratas fueron anestesiadas con Ketamina, 70mg/kg (Ketolar®, Parke-Davis), Xilacina, 5 mg/kg (Rompum®, Bayer), y Atropina 0,05 mg/kg, para evitar las secreciones (B. Brown medical S.A.). Tras la comprobar que los reflejos estaban abolidos, se rasuró la cabeza y se fijó el cráneo del animal en un aparato para cirugía estereotáxica de roedores (Kopf, David Kopf instrument, Tujunga, California). Para mantener la temperatura corporal y evitar la hipotermia se situó una manta térmica debajo del animal y se fijó a 38º centígrados (T-Pump ®, Gaymar Industries, Orchard Park, New Yersey, EEUU); también se aplicó vaselina líquida sobre las corneas para evitar la

dsecación de las mismas (AGA, Prior Velho, Portugal) y solución antiséptica sobre la piel de la cabeza (Betadine®, Viatris, Burdeos, Francia).

Una vez fijado el animal, se volvió a comprobar la ausencia de reflejos, y con la ayuda de un bisturí se procedió a la realización de una incisión longitudinal a nivel de la línea media. Se rebatió la piel, se levantó la gálea aponeurótica, y se retiró el periostio con la ayuda de un periostiotomo, dejando expuesto el cráneo. Para los experimentos donde era necesario realizar registros en corteza de barriles, se amplió el área de cráneo expuesto, para ello se desinsertó el músculo temporal mediante disección roma para evitar el sangrado excesivo. Se comprobó que los puntos de referencia bregma y lambda estaban en el mismo plano vertical, tras dicha comprobación se procedió a la localización de las coordenadas antero-posterior (desde bregma), y medio lateral (desde la línea media) de las regiones de interés (Paxinos y Watson 2007). Una vez tomadas las coordenadas, se realizó una craneotomía pequeña de aproximadamente 1mm^2 utilizando una trepanadora (Dremel® Modelo 225, Dremel) dejando una fina lámina ósea, que posteriormente se retiró con la ayuda de un bisturí, con el objetivo de dañar lo menos posible las meninges y las capas superficiales de la corteza por el cual se insertó un electrodo metálico de tungsteno (World Precisión Instruments, Reino Unido) en el caso de experimentos electrofisiológicos, o una jeringa Hamilton (World Precisión Instruments, Reino Unido) en el caso de experimentos con trazador neuronal retrogrado.

En el caso de los experimentos con trazador neuronal retrogrado, tras la inyección se taponó la craneotomía con gelatina homeostática (Espongostan Film, Ferrosan A/S, Soeborg, Dinamarca) humedecida en suero salino, y se suturo la piel con seda trenzada estéril (Lorca-Marín, Murcia, España) antes de la recuperación anestésica del animal, se realizaron inyecciones subcutáneas de Buprenorfina, $0,075\text{mg/Kg}$ (Buprex®, Reckitt Benckiser Healthcare, Reino Unido) cada 12 durante 48/72 horas para evitar el dolor posterior a la cirugía, se observó la correcta recuperación y supervivencia del animal hasta la perfusión transcardíaca 7 días después.

Para los experimentos electrofisiológicos en los que fue necesario procesamiento histológico post mortem, finalizado el registro, se inyectó una dosis letal de pentobarbital sódico (80 mg/Kg) y se procedió a la perfusión transcardiaca.

3.3 Perfusión transcardiaca

Para la realización de la perfusión se administró a los animales una inyección letal de pentobarbital sódico (80mg/kg). Se comprobó la ausencia de reflejos ante estímulos dolorosos, y tras asegurarse de la completa arreflexia, se abrió la cavidad abdominal, se cortó la parrilla costal, y se cortó el diafragma, dejando expuesto el corazón, a continuación se retiró el pericardio y se introdujo una aguja hipodérmica en el ventrículo izquierdo con borde romo unida a una bomba peristáltica, por el que se hizo circular una solución de cloruro sódico 0,9% heparinizado para retirar la sangre del sistema vascular y se cortó la aurícula derecha para permitir la evacuación del líquido. Tras comprobar que el suero salía por la aurícula derecha libre de sangre, se cambió a solución fijadora de paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato al 0,1M y se introdujeron 500 ml de esta solución. Después de asegurarse de la correcta fijación de los tejidos se extrajo el encéfalo del animal y se mantuvo en postfijación, en la misma solución fijadora durante al menos 24/36 horas y después se introdujo el cerebro en solución de sacarosa al 30% en tampón fosfato 0,1M en agitación para crioproteger el tejido.

3.4 Registros electrofisiológicos

3.4.1 Registros Unitarios

Los registros unitarios extracelulares se llevaron a cabo con microelectrodos de tungsteno (World Precisión Instruments, Reino Unido) con una impedancia de 2-5 mΩ, los cuales se colocaron en un micromanipulador (modelo 2660, Koft, Tujunga, California, EEUU) y se bajaron a las coordenadas estereotáxicas previamente establecidas: Corteza de barriles (A: -0,3-4.3 mm, L:0,1–0,6 mm, DV:0,2–0,6 mm para capa 2/3 , 0,8–1,5 mm para capa 5/6) núcleo posterior-medial (A: 3.4 mm, L:3 mm, DV:67 mm) y núcleo principal del trigemino (A:-8.8,10,4 mm, L:2.5–3.5 mm, DV:8–10 mm; según Paxinos y Watson, 2007). La señal analógica registrada se filtró entre 0,3 KHz y 3 KHz y se amplificó 100 veces mediante un preamplificador (P15, Grass West Warwick, USA) y posteriormente 30 veces mediante amplificador 1902 Cambridge Electronic Design, Reino Unido). Esta señal fue digitalizada, con una frecuencia de muestreo de 10 KHz, mediante conversor analógico-digital (1401 plus, Cambridge Electronic Design, Cambridge, Reino Unido) controlado por el programa Spike 2 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, Reino Unido) instalado en un PC. Para facilitar la detección de potenciales de acción generados por la estimulación de las vibrisas, la señal amplificada fue convertida a una señal de audio mediante un amplificador conectado a un altavoz, con el fin de percibir aquellas vibrisas que generaban potenciales de acción en la neurona registrada y determinar su campo receptivo.

3.4.2 Registros Electrocuticograficos

Para el estudio de potenciales evocados, se han utilizado electrodos de tungsteno (World Precision Instruments, Reino Unido) de 0,5 MΩ a 1MΩ que se colocaron en las coordenadas estereotáxicas de la corteza de barriles, S1, (AP: -0,3 mm, L: 4–6 mm, DV: 0,3-1,5 mm); Corteza Auditiva A1 (AP: -4.8mm, L:

6.5-7mm, DV: 1,5mm) y en la corteza prefrontal medial CPFm (AP: +3 mm, L: 0,2–0,8 mm, DV: 1–5 mm), con la ayuda de un micromanipulador (modelo 2660, Koft, Tujunga, California, EEUU) para los registros en CPFm, y de un micromanipulador manual (Narishigi, Japón) para los registros en corteza de barriles y corteza auditiva. La señal analógica registrada se filtró entre 0,3 Hz y 300 Hz y se amplificó 100 veces mediante un preamplificador (P15, Grass West Warwick, EEUU) y posteriormente 30 veces mediante amplificador 1902 (Cambridge Electronic Design, Reino Unido). Para asegurar la correcta localización de los electrodos en la corteza de barriles S1 se realizaron registros multiunitarios y tras comprobar que vibrisa daba la mayor respuesta a la estimulación, la señal fue filtrada para registros ECG. Esta señal fue adquirida de manera continua, con una frecuencia de muestreo de 1KHz, mediante un conversor analógico-digital (1401 plus, Cambridge Electronic Design, Cambridge, Reino Unido) controlado por el programa Spike 2 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, Reino Unido) instalado en un PC. Se extrajeron los potenciales evocados somatosensoriales (PES) en la CPFm y S1, mediante el cálculo del promedio de 60 estímulos en las vibrisas. Para los potenciales evocados auditivos (PEA) en la CPFm y en A1 se extrajeron mediante promediado de 60 clics de sonido.

Por el proceso de adquisición, entendemos una serie de pasos que se realizan desde la señal cruda analógica es finalmente digitalizada para su visualización y almacenamiento en el ordenador. Si bien, es fundamental prestar especial atención a la frecuencia de muestreo o resolución horizontal que vamos a seleccionar y la resolución vertical de nuestro amplificador. La frecuencia de muestreo nos dice el número de datos por segundo que el conversor analógico-digital va a tomar de nuestra señal original. Si utilizamos una frecuencia baja de muestreo, nuestra señal digitalizada estará distorsionada, si utilizamos una frecuencia demasiado alta, nuestra señal digital reproducirá a la perfección la señal original, sin embargo, el consumo de memoria será muy elevado, algo que dificultará el análisis. Para ello utilizamos el teorema de Shannon-Nyquist que establece que la señal debe muestrearse a una frecuencia al menos el doble que la frecuencia máxima de interés contenida en la señal. Por tanto, si queremos estudiar una señal de 100Hz, debemos muestrearla, al menos, a

200Hz. Las frecuencias de muestreo utilizados en estos estudios cumplen ampliamente estos criterios.

Por otra parte, la resolución vertical, es un parámetro que no podemos modificar y viene dado de fábrica ($\pm 5V$ en nuestra tarjeta CED 1401). En nuestro caso disponemos de 16 bits, por tanto $2^{16} = 65536$ puntos de resolución vertical, lo cual es una resolución muy alta que junto al factor de amplificación que le hemos aplicado y el filtro utilizado nos va a permitir estudiar componentes pequeños como los PES y PEA en corteza prefrontal medial de la rata con gran resolución y precisión.

3.5 Procedimientos de estimulación

3.5.1 Estimulación sensorial

Para la estimulación de las vibrisas se utilizaron breves pulsos de aire de 20ms de duración; para ello se utilizó una bomba de presión neumática (Picospritzer, Parker Hannifin, EEUU). Para la estimulación de una única vibrisa, estos pulsos de aire circularon a través de un tubo de polipropileno de 0,5mm y se aplicaron sobre una vibrisa. Las vibrisas fueron recortadas a una longitud de aproximadamente 5mm para evitar movimientos complejos. La presión fue ajustada a $1-2 \text{ Kg/cm}^2$, de tal manera que el movimiento de la vibrisa en retracción fue de aproximadamente 15° . Cuando se aisló una única neurona, se mapeo su campo receptivo usando un pincel. Una vez determinado el campo receptivo, y tras comprobar que vibrisa generaba potenciales de acción en la neurona, aquella vibrisa que generó la mayor respuesta, fue denominada vibrisa principal, y fue la que se usó para los posteriores protocolos de estimulación en los experimentos de adaptación.

3.5.1,1 *Protocolo para estudiar la adaptación de la respuesta*

Una vez detectada la vibrisa principal de la neurona registrada, se generaron pulsos de aire a diferentes frecuencias (0,5Hz, 1Hz, 2Hz, 5Hz, 8Hz, y 10Hz). Se aplicó un protocolo de 40 pulsos de aire de 20 ms de duración en una vibrisa y se dividió en cuatro periodos de 10 estímulos. Se registró en las capas 2/3 y 5/6 de la corteza de barriles, núcleo ventral postero-medial, y núcleo del trigémino principal. Se calculó el Histograma peri-estimulo (PSTH) y se determinó el número de espigas evocadas en una ventana de tiempo de 50 milisegundos desde la aparición del estímulo. Se normalizó a la respuesta del primero periodo al 100% y se comparó con los siguientes 3 periodos de estimulación, para obtener la curva de caída de la respuesta para cada estructura registrada. (Fig. 5).

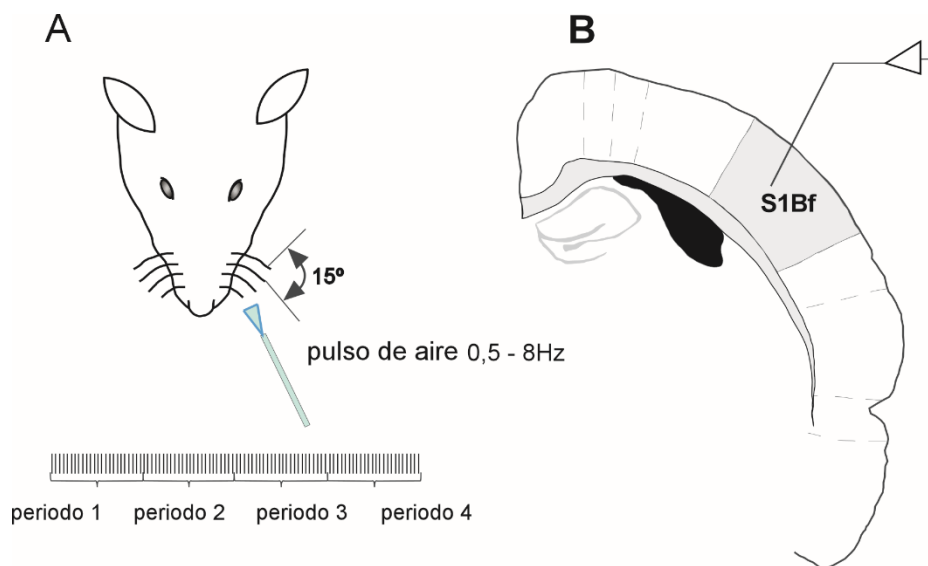


Figura 5. Protocolo utilizado para los experimentos de adaptación. A, aplicación de pulsos de aire en una vibrisa de 20ms de duración. Se aplicaron diferentes frecuencias de estimulación (0,5Hz a 8Hz) a cada frecuencia de estimulación; el total de estímulos fueron 40, B, imagen representativa del lugar de registro en corteza de barriles. S1Bf: corteza de barriles.

3.5.1.2 *Protocolo para estudiar la respuesta sensorial en corteza prefrontal*

Una vez detectada la actividad en corteza de barriles a la estimulación de las vibrisas o a un click de sonido, se introdujo un electrodo en la corteza prefrontal medial para el registro de potenciales y potenciales auditivos

Se aplicaron dos protocolos para estudiar si existe interferencia por aplicación simultanea de dos estímulos: los protocolos consistieron en 3 periodos de 60 pulsos de aire en las vibrisas a 1Hz, el primero de ellos fue considerado control, se normalizó al 100% de la respuesta, y se comparó con el segundo periodo en el cual se aplicó el estímulo distractor, que consistió en estimular de manera constante con un pincel las vibrisas del lado contrario (protocolo A, Fig. 6), o aplicar un ruido blanco continuo de 50 dB o 60dB (protocolo B, Fig. 6) con el fin de determinar si existe un cambio en el área del potencial evocado somestésico en la CPFm.

Para el estudio de la interferencia de los potenciales evocados auditivos (PEA) solo se aplicó el protocolo 1 (Fig. 6). El tercer periodo se utilizó para comprobar si tras la distracción el valor de la respuesta recuperaba a los valores control.

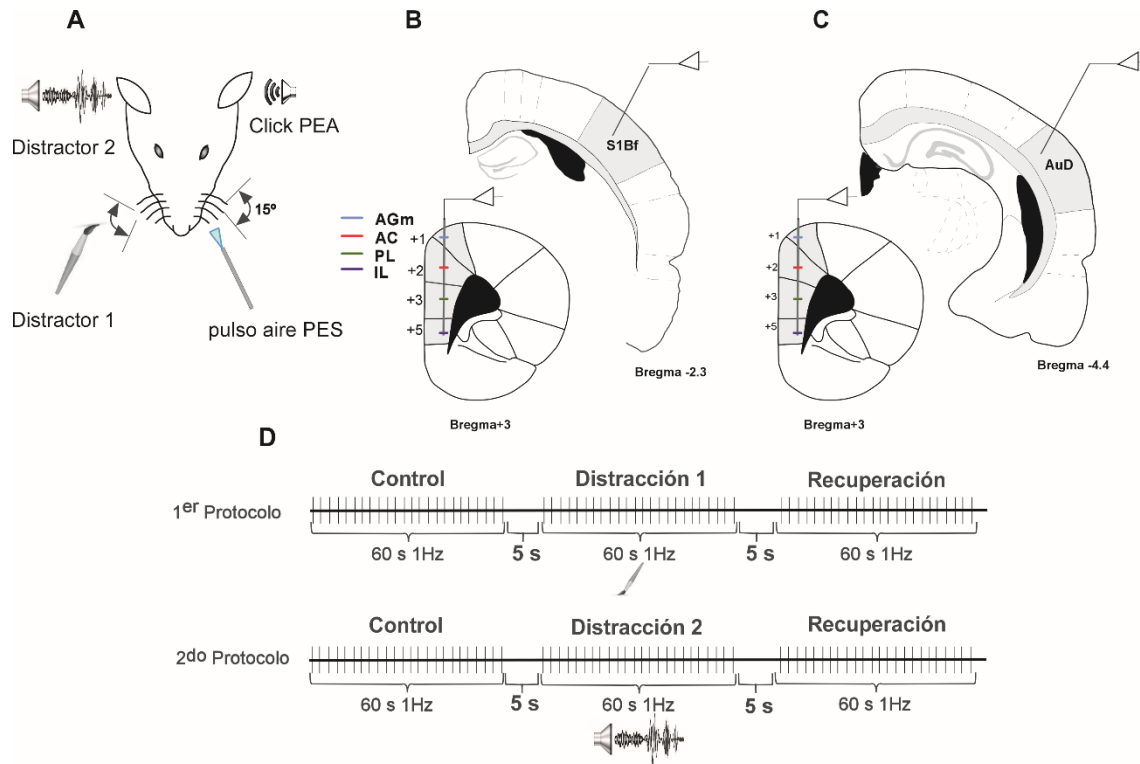


Figura 6. Protocolo usado para el estudio de la distracción en mPFC. A, ilustración del estímulo usado para la generación de potenciales evocados somestésicos (PES) o potenciales evocados auditivos (PEA) y los distractores usados. Para los potenciales evocados auditivos solo se utilizó el distractor 1, B, imagen esquemática de las áreas de registro de los PES. C imagen esquemática de las áreas de registro de los PEA. D, protocolo de estimulación. En el primer protocolo se utilizó un distractor somestésico, que consistió en la estimulación de las vibras de lado contrario, al utilizado para generar los PES. En el segundo protocolo se utilizó un distractor auditivo, que consistió en un ruido blanco (50dB, 10KHz-160KHz). AGm: corteza agranular medial, AC corteza cingular, Aud: Corteza auditiva, IL: Corteza infralímbica, PES: Potencial evocado somestésico, PEA: potencial evocado auditivo, PL, corteza prelímbica, S1Bf: corteza de barriles.

Para estudiar si existían cambios en la respuesta debidos a la aparición de un estímulo de diferente frecuencia o de distinta modalidad sensorial o por cambios en la secuencia de estimulación. Se diseñaron dos grupos de secuencias: A y B. El grupo que hemos llamado secuencia de estimulación A consistió en 2 periodos de 60 estímulos en las vibras a 1Hz, separados 10 segundos y se normalizó la respuesta del primer periodo al 100% y se comparó con el segundo periodo (protocolo 1 control, Fig. 7C). En los siguientes protocolos se introdujo un tren de 50 estímulos a 5Hz (entre los dos periodos de 60 estímulos) en las mismas vibras (protocolo 2, Fig. 7C), o un tren auditivo de “clicks” (contiene todas las frecuencias del espectro audible) a 5Hz Y 50 Db de intensidad (protocolo 3, Fig. 7C).

En el grupo que hemos llamado secuencia de estimulación B los protocolos fueron similares a los anteriores, y consistieron, en dos periodos de 50 estímulos a 5Hz (en lugar de a 1Hz como en el grupo A), al igual que en el caso anterior, el primer periodo se normalizo al 100% de la respuesta, y se comparó con el segundo periodo (Fig. 7C).

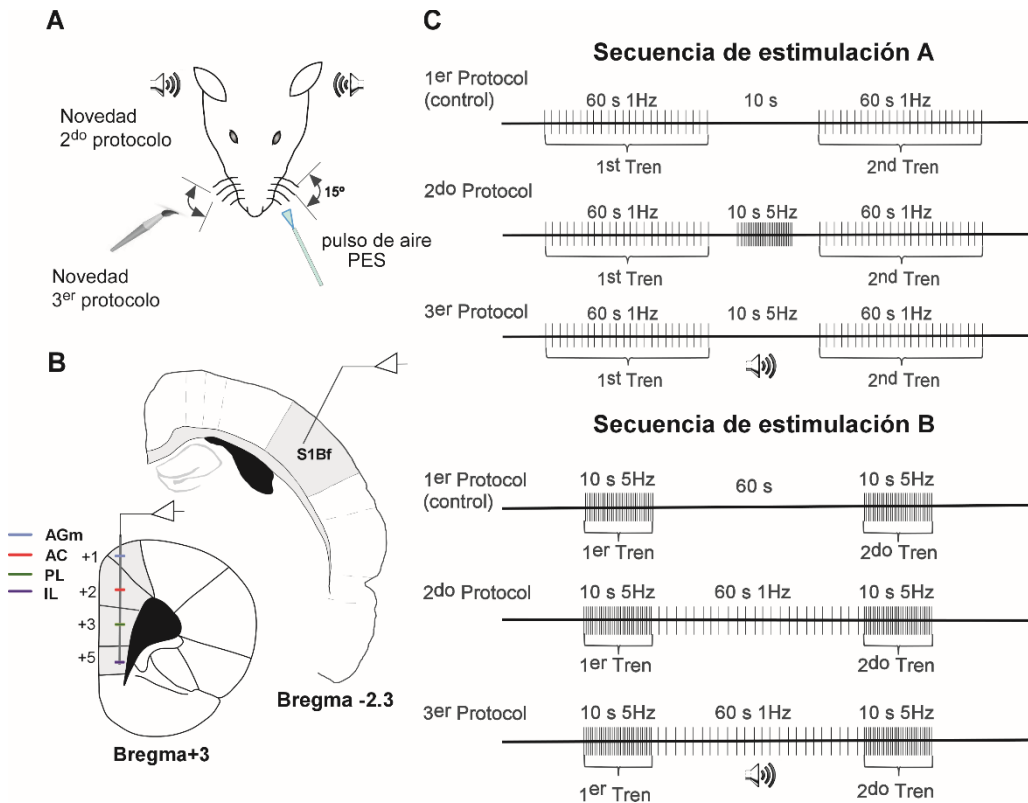


Figura 7. Protocolo usado para estudiar los cambios de respuesta debidos a cambios en la secuencia de estimulación. A, esquema ilustrativo de los estímulos usados para la generación de PES, y de los estímulos novedosos. B, lugares usados para el registro de PES. C, Secuencias de estimulación utilizadas. AGm: corteza agranular medial, AC corteza cingular, Aud: Corteza auditiva, IL: Corteza infralímbica, PES: Potencial evocado somestésico, PL, corteza prelímbica, S1Bf: corteza de barriles.

3.5.2 Estimulación eléctrica

La estimulación eléctrica de la porción horizontal de la banda diagonal de Broca (HDB) en su región rostral (AP: +0,5mm L: 0,6mm, DV: 8.3mm), o para la región caudal (AP: -0,48mm, L: 1,5mm, DV: 8,5mm) se aplicó mediante electrodos trenzados de 100 μ m de diámetro de acero inoxidable (A.M Systems o WPI) implantados con cemento dental y se aplicó un tren de 50Hz durante 1 s, 20-100 μ A, en configuración bipolar a través de una unidad de aislamiento (165, Cibertec, España) asociada a un estimulador eléctrico (CS-20 Cibertec, España).

El protocolo consistió en un periodo control (P1) de estímulos en las vibrisas, el cual se normalizo al 100% de la respuesta, tras el cual se aplicó un tren eléctrico de 50Hz en HDB, 1s, 20-100 μ A. El resto de periodos de estimulación de las vibrisas (P2, P3, P4, P5) se compararon con el periodo control (P1) con el objetivo de calcular el porcentaje de cambio debido a la estimulación eléctrica (Fig. 8C).

Para la estimulación eléctrica de la corteza de barriles, así como para la estimulación de la corteza auditiva, se utilizaron electrodos bipolares de 100 μ m y se aplicaron pulsos cuadrados a 1 ms de duración, 20-100 μ A, con el fin de obtener respuestas de potenciales de acción en la corteza prefrontal por estimulación directa de las cortezas sensoriales S1 y A1; para ello se utilizaron dos unidades de aislamiento (SIU, West Warwick, EEUU) asociadas a un estimulador eléctrico de doble canal (Grass S88, West Warwick, EEUU).

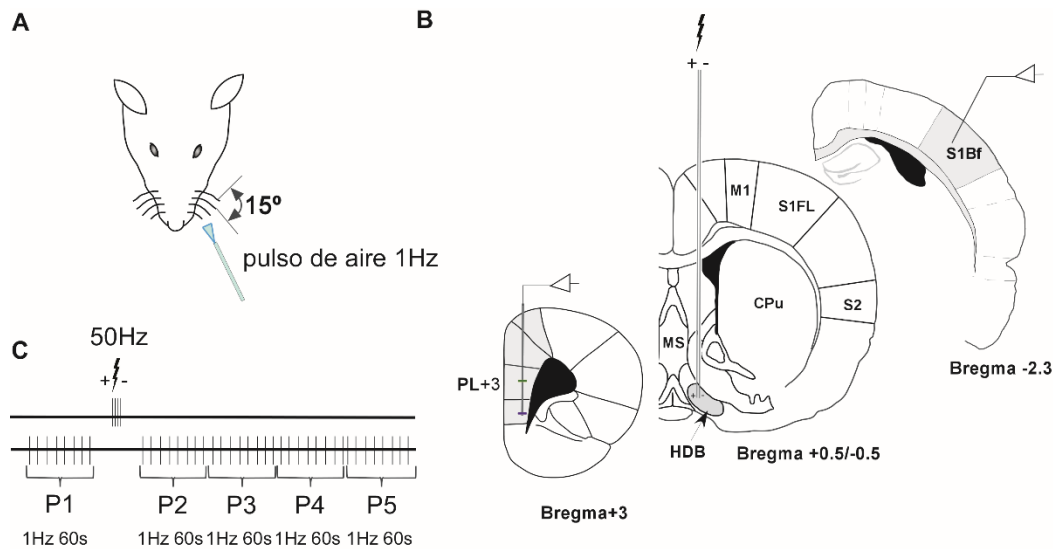


Figura 8. Protocolo usado para estimulación eléctrica de la banda diagonal de broca (HDB). A ilustración del estímulo usado para la generación de PES. B, secciones coronales ilustrativas del lugar utilizado para el registro de PES y de estimulación del HDB. C, Protocolo de estimulación utilizado. CPu: Caudado-Putamen, HDB: porción horizontal de la banda diagonal de broca, M1 corteza motora primaria, MS: septum medial, PL: corteza prelímbica, S1FL: corteza somestésica primaria representación de la extremidad anterior, S1Bf: corteza de barriles, S2: Corteza somestésica secundaria.

3.5.3 Estimulación optogenética

Para la estimulación optogenética y los registros electrofisiológicos de los experimentos de optogenética, se usaron ratas de 2-3 meses de edad. Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de Ketamina (100mg/kg) y Xylacina (3mg/kg), y se fijaron en aparato estereotáxico para inyección de vector viral basado en un virus adeno-asociado (AAV5-CaMKII α ::ChR2(H134R)-eYFP.WPRE.hGH, Addgene26969P, Penn Vector Core, University of North Carolina) dirigido a las coordenadas estereotáxicas de la porción horizontal de la banda diagonal de Broca (AP: +0,24mm, L: 1,5mm, DV: 8.8mm). Este virus en particular lleva a la expresión del canal de cationes ChR2 (Channelrodopsin-2) activado por luz, y de la proteína eYFP (enhanced yellow fluorescent protein) bajo el promotor de la proteína CA²⁺ / Calmodulina proteinkinasa II α (CaMKII α). Tras la cirugía los animales tuvieron un periodo de 4 semanas de recuperación antes de los experimentos electrofisiológicos. La estimulación óptica de las neuronas que expresaron ChR2 se realizó mediante un diodo de emisión de luz

(LED: 473nm, Thomas Recording, Alemania), a través de una fibra óptica (120 μm) posicionada directamente sobre la porción horizontal de la banda diagonal de broca. El LED fue controlado mediante un pulso cuadrado de 1 s de duración. La intensidad de iluminación fue $<30\text{mW}/\text{mm}^2$.

Para estudiar los efectos de la estimulación optogenética de HDB sobre las respuestas táctiles se registraron los potenciales evocados PES somatosensoriales en CPFm y S1 (Fig. 9A). Se aplicaron dos trenes de 60 estímulos en las vibrisas (1Hz, 2 minutos), y se calculó el área del PES de ambos trenes, cuya media fue considerada el control de la respuesta (100%). Posteriormente, se aplicó el estímulo optogenético, y a continuación se volvió a estimular las vibrisas durante 4 minutos a 1Hz. Este periodo se dividió en 4 trenes de 60 estímulos para estudiar la evolución del área del PES después de la estimulación (Figura 9C).

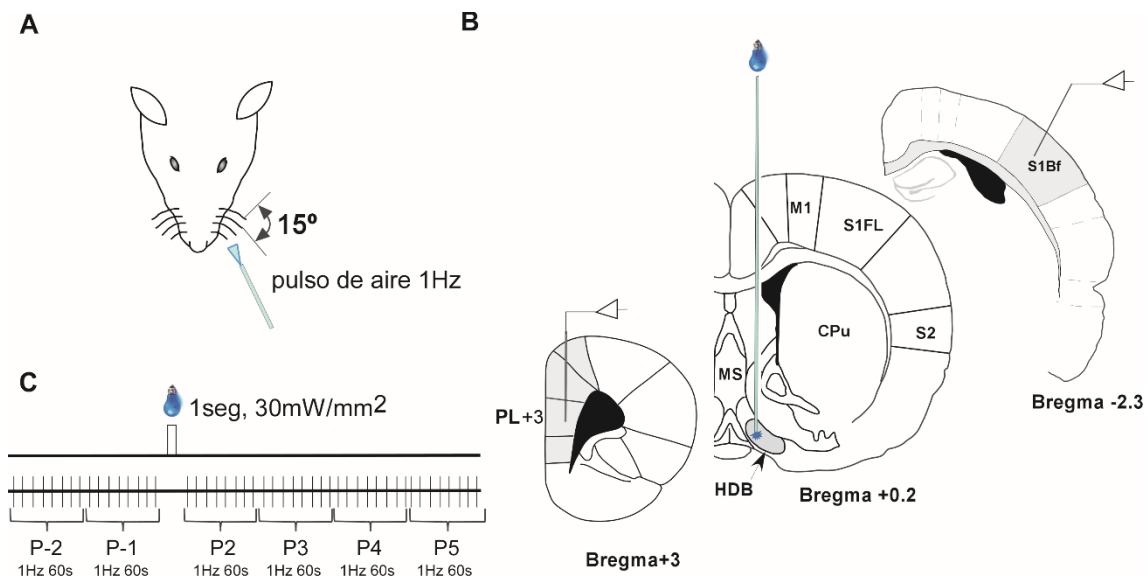


Figura 9. Protocolo usado para estimulación optogenética de la banda diagonal de broca (HDB). A. Ilustración del estímulo usado para la generación de PES. B. Secciones coronales ilustrativas del lugar utilizado para el registro de PES y de estimulación del HDB. C. Protocolo de estimulación utilizado. CPu: Caudado-Putamen, HDB: porción horizontal de la banda diagonal de broca, M1 corteza motora primaria, MS: septum medial, PL: corteza prefrontal, S1FL: corteza somestésica primaria representación de la extremidad anterior, S1Bf: corteza de barriles, S2: Corteza somestésica secundaria.

3.6 Aplicación de Drogas

Durante la realización de los experimentos se utilizaron las siguientes drogas:

- En los estudios de la modulación colinérgica de la adaptación en corteza de barriles se aplicó ACh intracortical 10 μ M, 0,1 μ l disuelta en suero salino, en las capas 2/3 y capa 5/6.
- Para los estudios de modulación colinérgica de las respuestas sensoriales, así como de la modulación de los fenómenos de distracción en la CPFm de la rata, se aplicó eserina (Sigma-Aldrich, EEUU), antagonista de la enzima acetilcolinesterasa, 1mg/kg (i.p.). Tanto para el estudio del papel de los receptores muscarínicos y nicotínicos en la modulación colinérgica de la adaptación, como de la respuesta sensorial de la CPFm se aplicó, vía intraperitoneal, un antagonista no selectivo de los receptores muscarínicos, sulfato de Atropina (Sigma-Aldrich; 1mg/1kg) o mecamilamina (Sigma-Aldrich; 1mg/Kg), antagonista no selectivo de los receptores nicotínicos, 10 minutos antes de la inyección de ACh o eserina.
- Para la determinación de la implicación de las interneuronas parvalbumina positivas corticales en la modulación de las respuestas sensoriales en la CPFm se inyectó intracorticalmente ω -agatoxina IVa (Alomone Lab, Jerusalén, Israel), bloqueante selectivo de los canales activados por voltaje P/Q de Calcio. Se inyectó mediante una cánula de 0,5 mm de diámetro acoplado a una jeringa tipo Hamilton (World Precisión Instruments, Reino Unido).

3.7 Inyección y revelado del trazador retrogrado

Para la realización de los experimentos de trazado neuronal retrogrado, se utilizó un trazador fluorescente, visible con microscopía de epifluorescencia y lo suficientemente fotoestable, como para permitir el visionado del marcaje sin pérdida significativa a lo largo del tiempo, el trazador utilizado fue Fluoro-Gold, (methanesulfonato de hydroxystilbamidina, Fluorochromes, Llc., Denver, USA)

diluido en tampón fosfato 4%. EL Fluoro-Gold, si bien es cierto que produce cierto daño tisular, y necrosis en la zona del depósito, esto no parece afectar significativamente al transporte retrogrado. EL trazador es captado por las terminales neuronales presentes en la zona del depósito, y es transportado retrógradamente a través de vesículas hasta el soma neuronal; una vez allí, marca el núcleo neuronal, el citoplasma y las dendritas (Schmued y Fallon, 1986); el Fluoro-Gold es útil para marcar grandes poblaciones de neuronas.

Se realizaron inyecciones de Fluoro-Gold en la corteza prefrontal medial en su región más dorsal y en su región más ventral, con el fin de determinar si hay un origen directo de entrada de información sensorial a la corteza prefrontal medial. Para el depósito del Fluoro-Gold se utilizó una cánula de 0,5 mm de diámetro acoplada a una jeringa del tipo Hamilton (World Precision Instrument, Reino Unido); se inyectó un volumen de 60 nl. Tras la inyección del trazador, el periodo de supervivencia fue de 7 días para asegurar el transporte completo del trazador, tras los cuales se procedió a la perfusión y postfijación del cerebro. Los cerebros fueron bloqueados y crioprotegidos con una solución de sacarosa al 30% en tampón fosfato (PB 0,1M) y se mantuvo durante 48 horas en agitación a 4°C. Posteriormente y tras asegurarse que el cerebro se había hundido en la solución crioprotectora, se cortó en micrótomos de congelación (Leica SM2400) en secciones coronales de 60 µm, y se ordenó dichas secciones en dos series en cajas multipocillos con PB 0,1M. Una de las series fue montada inmediatamente de forma ordenada según el eje antero-posterior sobre un portaobjetos (Menzel-Glaser®, Menzel GmbH & Co) para evitar la difusión del trazador en el tejido. Una vez montadas las secciones, se comprobó que el sitio de inyección era correcto mediante un microscopio de epifluorescencia. Una vez validada la localización, se secaron los cortes durante una noche. Al día siguiente se procedió a la deshidratación de las secciones, mediante inmersiones en etanol de graduación creciente (70°, 80°, 96° y 100°) durante 15 s en cada uno de ellos. Tras la deshidratación se procedió a la inmersión en xileno durante 1 hora, y posteriormente cubiertas con cubreobjetos impregnados en DePex (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Alemania). La segunda serie se reservó para procesamiento histológico con técnica de Nissl para la identificación de estructuras.

En las inyecciones de trazador retrogrado con Fluoro-Gold, se han representado cualitativamente las neuronas marcadas retrógradamente. Para ello fotografiamos las secciones a 4x y se realizó un mosaico con el programa NIS elements (Nikon, Holanda) y con microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse 600 con filtro UV2A ex 330-380nm). Las secciones seleccionadas fueron aquellas representativas de área somestésica y auditiva y las secciones y en las que se localizó el centro de la inyección. A continuación, la imagen mosaico bidimensional obtenida fue importada al programa Canvas X (ACD Systems, EEUU). Sobre estas imágenes se dibujaron los contornos de los cortes, y se delimitaron las áreas según Paxinos y Watson (2007). Se representó con un círculo cada soma neuronal marcado retrógradamente, hasta representar sobre el dibujo todos los somas marcados en las secciones seleccionadas.

3.8 Procesamiento Histológico mediante la Tinción de Nissl

La tinción de Nissl (Nissl, 1913) fue la técnica usada para delimitar estructuras, y divisiones en las que se encontró el marcador neuronal retrogrado, así como para la localización de los electrodos de registro. Esta técnica histológica básica tiñe los ácidos nucleicos de la cromatina y los polirribosomas citoplásmaticos, llamados gránulos de Nissl, esto ocurre por la alta afinidad que tienen estos gránulos por los colorantes catiónicos, en concreto por el violeta de cresilo.

Para la realización de esta técnica los cortes coronales previamente cortados, se montaron en PB 0,1M diluido sobre un portaobjeto previamente gelatinizado (para favorecer la adherencia del tejido) ordenados siguiendo un orden antero-posterior y se dejaron secar durante una noche, y al día siguiente, sumergidos en etanol al 70% durante otra noche. Transcurrido este tiempo se lavaron en agua destilada durante 5 s, y a continuación se sumergieron en violeta de cresilo al 2% durante 5 minutos en agitación a temperatura de 45°C; posteriormente se lavaron los cortes en agua destilada durante 60 s, se sumergieron los cortes nuevamente en alcohol de 70° durante 30 s y a continuación en alcohol de 96° durante otros 30 s. Tras la deshidratación, se

sumergieron los cortes en cloroformo (Panreac) al 100% durante 10 minutos. Pasado este tiempo se lavaron en etanol de 96° y se introdujeron en diferenciador (980 ml de etanol de 96° y 20 ml de ácido acético glacial, Panreac) hasta que la sustancia blanca del tejido estuviese de color blanquecino. Tras comprobar que se había diferenciado correctamente la sustancia blanca y la sustancia gris, se lavaron los cortes en alcohol de 100° durante 1 minuto, y finalmente se hicieron 6 aclarados de 10 minutos en xileno (Panreac) y a continuación se cubrieron con cubreobjetos impregnado en DePex (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Alemania).

3.9 Revelado de la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa es una enzima que de forma específica hidroliza la ACh a nivel del espacio sináptico, escindiéndola en colina y acetato. Esta enzima muestra la presencia de ACh en la sinapsis. El protocolo utilizado es el de Geneser-Jensen y Blackstad (1971). Consistió en la incubación de los cortes en una solución de acetilcolina al 10%: acetilcolina: 100 mg, sulfato de cobre: 50 mg, glicina: 75 mg etopropacina: 23 mg, acetato sódico: 410 mg, y agua destilada; 100 ml de solución se ajusta a pH: 5. La acetilcolina sirve de sustrato de la enzima, por lo que se genera una reacción enzimática en el tejido; la etopropacina se usa para inhibir las colinesterasas inespecíficas. Tras la incubación de los cortes durante el tiempo suficiente, se procedió al revelado de la actividad enzimática. Para el revelado se utilizó una solución de agua destilada 100 ml y ferrocianuro potásico 10 mg (10%).

El desarrollo completo del procedimiento fue el siguiente: los cortes seleccionados de corteza prefrontal fueron lavados en agua destilada durante 10 minutos en agitación. Tras el lavado se sumergieron los cortes en solución de incubación a temperatura ambiente aproximadamente de 24°C en agitación y protegidos de la luz durante aproximadamente 1 hora y 30 minutos. A continuación, se sumergieron los cortes en la solución de revelado durante aproximadamente 3 minutos, hasta que los cortes adquirieron el color adecuado. Se lavaron los cortes en PB, 3 veces durante 10 minutos, y se

procedió al montaje de los cortes en PB 0,1 M diluido sobre portaobjetos previamente gelatinizados para favorecer la adherencia del tejido, y se dejaron secar durante aproximadamente una noche. Al día siguiente, los cortes fueron deshidratados en alcohol creciente 70%, 80%, 95% y 100% durante 1 minuto en cada uno de ellos. Tras la deshidratación se sumergieron cortes 6 veces en xileno durante 10 minutos, posteriormente se cubrieron los cortes con cubreobjetos impregnados en DePex (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Alemania).

3.10 Análisis de los datos electrofisiológicos

Los registros unitarios se consideraron adecuados para el análisis cuando cumplían unos criterios de estabilidad: la fluctuación de la amplitud de las espigas fue inferior al 10% a lo largo del registro, y su amplitud fue al menos 3 veces el valor de la amplitud del ruido. Teniendo en cuenta la resistencia del electrodo es común contar en el registro con diversas espigas de diferente amplitud, lo que da cuenta de la existencia de más de una neurona, por tanto, se aplicaron umbrales de amplitud para separar las espigas que eran similares en cuanto a este criterio, para posteriormente generar un buffer para cada una de ellas, y su posterior análisis independiente.

Para el análisis se calculó el histograma periestímulo (PSTH). Este método es utilizado para cuantificar el número de espigas que ocurren en torno a un evento de estimulación o suceso puntual de referencia; en nuestro caso fue o bien un estímulo sensorial o un estímulo eléctrico. Cada estimulación se toma como un suceso independiente y se contabiliza el número de espigas que suceden en un periodo de tiempo seleccionado (bin), 1ms en nuestro caso, a lo largo de una ventana de tiempo seleccionada en nuestro caso 50ms desde que ocurrió el evento puntual. Por tanto, la sumatoria de todos los sucesos independientes da como resultado la superposición de las espigas en forma de histograma; en el eje Y se representa el número de las espigas, y en el eje X se

representa el tiempo. Por tanto, cada barra del histograma se corresponde con el bin seleccionado de 1ms. (Perkel et al., 1965).

Se calculó la latencia inicial (onset), es decir, el tiempo transcurrido desde la aplicación del estímulo hasta el comienzo del pico de actividad evocada en el PSTH, este punto se considero teniendo en cuenta la actividad espontanea, siendo este inicio aquel en el que existen al menos el triple de espigas que en periodo correspondiente a la actividad espontanea, de igual manera se observo la latencia offset (periodo en el cual el número de espigas en el PSTH corresponde a la actividad espontanea) con el objetivo de determinar la ventana de tiempo de actividad a analizar, que en nuestro caso fue suficiente con 50 ms desde el evento de estimulación.

En los estudios de respuesta sensorial en la CPFm, se aplicaron diferentes estímulos sensoriales durante el registro de la actividad de campo espontánea y se utilizaron los potenciales relacionados con acontecimientos discretos, clásicamente llamados potenciales evocados, para la identificación de la respuesta asociada a dicho estímulo. La actividad de campo es la actividad resultado de la suma de los potenciales postsinápticos tanto excitatorios como inhibitorios generados por cientos o miles (en función de la resistencia del electrodo y la distancia) de neuronas próximas al electrodo de registro principalmente de neuronas piramidales que guardan una orientación espacial que facilita la generación de un dipolo. Dicha actividad espontanea tiene que ver con acontecimientos originados en el entorno o en el propio sujeto, así como de las consecuencias (cognitivas, motoras, sensoriales, etc.) que dicho procesamiento conlleva, sin embargo, debido a que parte de esa actividad se desarrolla de manera simultánea a la actividad general espontanea no es posible identificarlos con facilidad. Por tanto, debido a que la actividad cortical espontanea en un animal anestesiado tiene una amplitud de decenas, e incluso de cientos de veces mayor, que la amplitud del potencial generado por un evento discreto, resulta difícil extraer de la señal, dado que la señal/ruido es muy baja. Para detectar la señal evocada por un estímulo dentro de la actividad cortical espontánea se calculó el promedio de la señal en torno a un acontecimiento puntual, el estímulo. El promediado es el resultado de sumar las ondas registradas en un registro de actividad de campo que se repite un

estímulo n veces, y dividido por n . Se sabe que la amplitud que alcanza la suma de n ondas de ruido (actividad espontánea no sincronizada con el estímulo) no es n veces la amplitud de cada una (n = número de ensayos) si no la \sqrt{n} . Ya que en cada ensayo la actividad cerebral espontánea puede adquirir una amplitud y un signo diferente. Por tanto teniendo en cuenta que la atenuación del ruido es proporcional a la raíz de n , la relación señal/ruido final

$$= \frac{\text{Señal final}}{\text{Ruido final}} = \frac{\text{Señal inicial}}{\text{Ruido inicial}} \times \sqrt{n} = \text{si despejamos } n \text{ de la formula anterior,}$$

obtendríamos el número de ensayos adecuado para tener una relación señal/ruido final adecuada, de al menos el doble, es decir que la amplitud de la señal supere al menos 2 veces la amplitud del ruido. Se sabe que cada condición experimental requiere de un número distinto de repeticiones del estímulo; resulta obvio que cuanto mayor es n , mayor será la reducción del ruido y más destacado será el potencial evocado. Y por tanto la razón señal/ruido final será mayor. Pero en ocasiones esto no es la mejor opción debido a que puede producirse habituación de la respuesta, o incluso cambios rápidos de actividad que alteren la respuesta.

Los potenciales evocados, consta de un numero variable de componentes que se distinguen por su diferente signo (voltaje negativo o positivo) y tiempo en el cual ocurren en referencia al estímulo. Para determinar las latencias y las amplitudes de la respuesta, se utilizó el tiempo en el que aparece el pico de mayor amplitud del potencial evocado del primer componente.

Para el análisis de los potenciales evocados, se calculó el área bajo la curva del primer componente; el área fue calculada tomando el valor del comienzo de la pendiente negativa, hasta el valor del mismo voltaje, pero con pendiente positiva (figura 10).

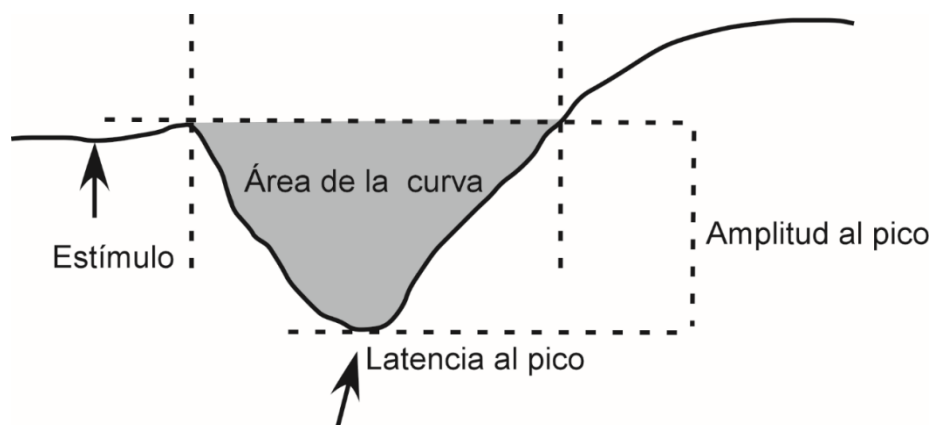


Figura 10. Ejemplo de potencial evocado y de los parámetros usados. Representación esquemática de los parámetros amplitud, latencia al pico, y área de la curva.

Los resultados se analizaron en un ordenador con el programa estadístico GraphPad Prism 5 (San Diego, EEUU); se comprobó la normalidad mediante la prueba Shapiro-Wilk, y se usó la prueba pareada de dos colas T-Student para comparaciones pareadas para los datos normales, y la prueba Wilcoxon para comparaciones pareadas para los datos que no cumplen el criterio de normalidad, así como el test de Mann Whitney para comparaciones independientes. Para comparaciones múltiples se utilizó el análisis de varianza de dos factores (ANOVA) más la prueba post-hoc de Bonferroni. Se consideraron diferencias significativas, cuando los valores de probabilidad fueron menores de 0,05. Los datos se indicarán como la media y el error estándar de la media. Se representa con * cuando $p < 0,05$, ** cuando $p < 0,01$ y *** cuando $p < 0,001$.

4. RESULTADOS

Para responder al primer objetivo de la presente Tesis, concretamente al objetivo 1.a, en la cual nos propusimos determinar las características de la respuesta de la corteza somestésica ante cambios en los patrones de estimulación. Realizamos los siguientes experimentos.

4.1 Adaptación de la respuesta en la corteza de barriles

Para el estudio de la adaptación de la respuesta a una estimulación repetitiva se registró la actividad de las neuronas de la corteza de barriles a diferentes profundidades tanto en actividad espontanea, como durante un tren de 40 estímulos a diferentes frecuencias para posterior cuantificación de la adaptación de la respuesta en función de la frecuencia de estimulación (Figura 11A). Para el registro de las neuronas presumiblemente de capas 2/3, el electrodo fue situado en profundidades comprendidas entre 200 – 600 μm (n= 139) para el registro de neuronas correspondientes a capas 5/6 el electrodo se situó en profundidades comprendidas entre 800-1500 μm (n=127; Figura 11B). Una vez registradas, se clasificaron en dos tipos, en función de su frecuencia de disparo en actividad espontanea, y de la duración del potencial de acción.

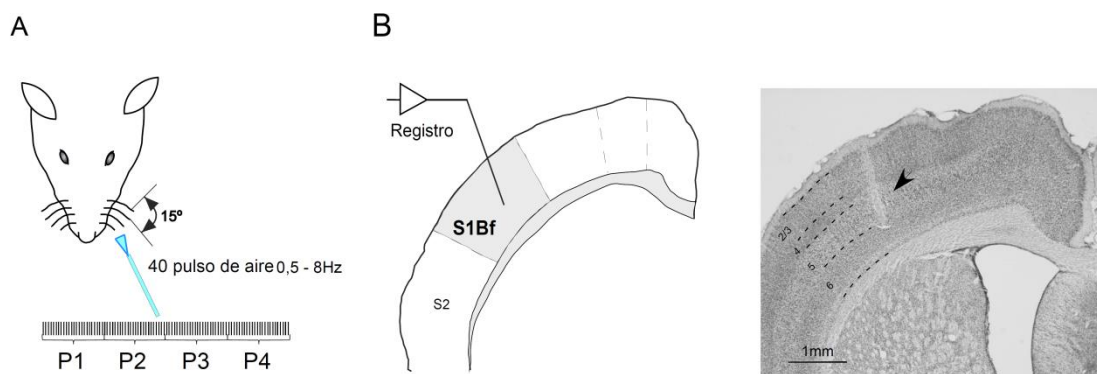


Figura 11. Protocolo de estimulación para el estudio de la adaptación. A. Esquema del protocolo, que consistió en 40 estímulos dirigidos a una vibrissa, divididos en 4 periodos (P1, P2, P3, P4) de 10 estímulos cada uno. B. Esquema anatómico de la zona de registro correspondiente a corteza de barriles, a la derecha se muestra una sección anatómica con tinción de Nissl, la flecha indica el trayecto del electrodo en la corteza de barriles. S1Bf: Corteza de barriles. S2 corteza somesetesica secundaria.

Las neuronas consideradas tipo 1 tanto en capas 2/3 como en capa 5/6 ($n = 266$ de un total de 281 neuronas, 94,6%) tenían una actividad espontánea inferior a 2 espigas por segundo (media, $0,5 \pm 0,2$), mientras que las neuronas consideradas tipo 2 ($n = 15$, de un total de 281, 4.4%) tuvieron una actividad espontánea (>10 espigas/s; 16.5 ± 3.7 espigas/segundo; $p < 0,001$) significativamente mayor que el tipo 1, Además, las neuronas clasificadas como tipo 1 tuvieron una duración media de la espiga de $0,7 \pm 0,3$ ms (componente negativo de la espiga) mientras que las clasificadas como tipo 2 tuvieron una duración media de la espiga menor ($0,4 \pm 0,3$ ms; componente negativo de la espiga; $p < 0,001$; Figura 12).

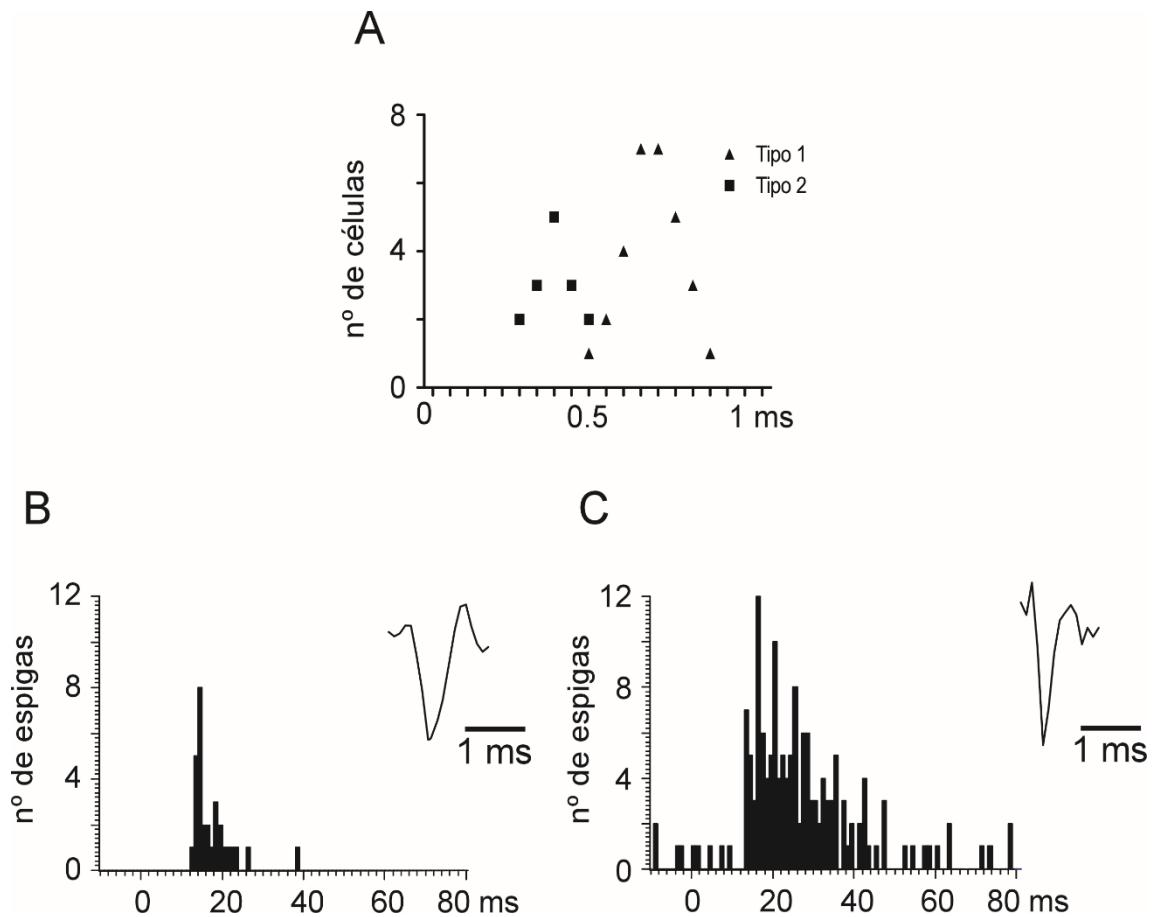


Figura 12. Características de la respuesta de las neuronas tipo 1 y tipo 2. A. en esta grafica se representa la duración de la espiga para las neuronas tipo 1 y tipo 2. B y C. Histograma periestímulo representativo de las neuronas tipo 1 y tipo 2. la imagen insertada, representa la media de la onda de las espigas de 10 neuronas de tipo 1(B) y de tipo 2(C).

Las neuronas clasificadas como tipo 1 en capas 2/3 respondieron a una o dos vibrisas (Figura 12B). La respuesta media a la vibrisa principal (aquella con respuesta mayor) fue de $0,9 \pm 0,1$ espigas/estímulo, cuando fue estimulada a 0,5Hz, la latencia media fue de 14 ± 2 ms ($n=139$). En las neuronas tipo 1 registradas en capas 5/6 fue similar en comparación con las de capas 2/3 ($0,8 \pm 0,1$ espigas/estímulo; $p=0,77$; latencia 15 ± 2 ms; $n=127$; $p=0,24$). Dada la baja tasa de disparo en actividad espontánea y el reducido campo receptivo, (1 o 2 vibrisas) sugiere que los registros fueron obtenidos de neuronas putativamente piramidales (Manns et al., 2004; De Kock et al., 2007; De Kock y Saakman, 2008). Además, las neuronas registradas en nuestro estudio están muy probablemente localizadas en barriles, dado el reducido campo receptivo y la corta latencia de las respuestas, además la eficacia de las respuestas fue similar a lo publicado por Melzer (2006), donde la eficacia de las neuronas de los barriles es distinta de las neuronas registradas en el septa.

Respecto de las neuronas clasificadas como tipo 2, no se encontraron diferencias significativas entre las neuronas registradas en capas 2/3 y las neuronas registradas en capas 5/6, por tanto, se agruparon juntas para los análisis posteriores. La tasa media de disparo de las neuronas tipo 2 tanto en capas 2/3 como en 5/6 fue $3,3 \pm 0,7$ espigas/estímulo y la latencia media fue de 16 ± 4 ms, cuando se estimularon 40 veces las vibrisas a 0,5 Hz ($n=15$; Figura 12C). Además, mientras que las neuronas tipo 1 respondieron en una ventana de tiempo corta después del estímulo, entre 10-30 ms, la respuesta de las neuronas tipo 2 podía alcanzar una ventana de tiempo de hasta 50ms después del estímulo (Figura 12B, C). Estos datos sobre las propiedades de disparo registradas en las que hemos clasificado como tipo 2, sugieren que se trata de neuronas inhibitorias (Markram, 2004).

Se registró la respuesta de las neuronas tipo 1 ($n=139$) a una estimulación periódica de 40 estímulos. Estas neuronas mostraron un decremento gradual de la respuesta conforme aumentaba la frecuencia de estimulación (0,5–10Hz; Figura 13A), hasta que alcanzaron una respuesta estacionaria, como ha sido publicado previamente (Ahissar, 2001; Chung et al., 2002; Khatri et al., 2004). Para cuantificar la adaptación de la respuesta de estas neuronas, se aplicó un tren de 40 estímulos a diferentes frecuencias (0,5 –10Hz), este tren fue dividido

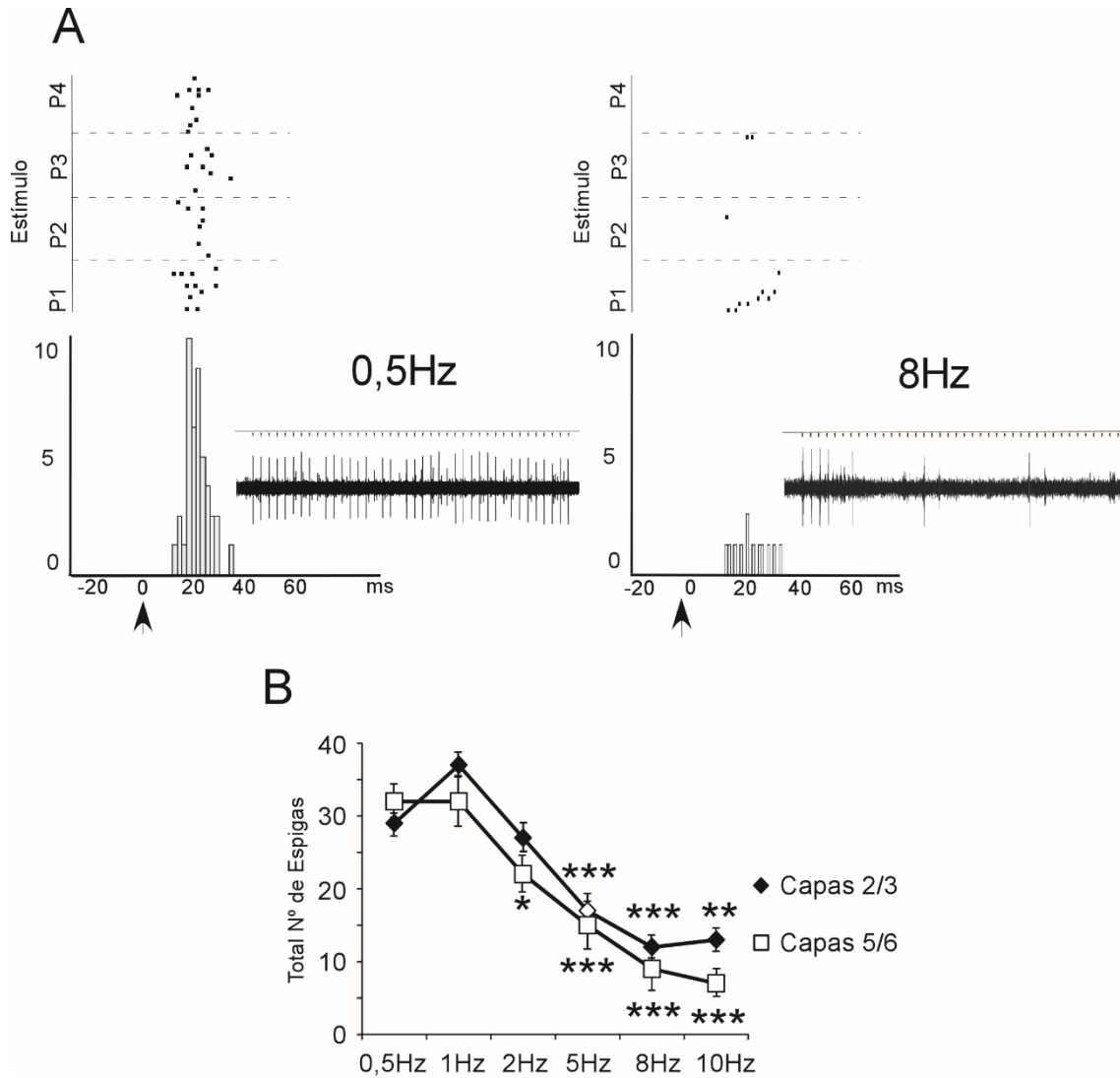


Figura 13. Las neuronas tipo 1 muestran una rápida adaptación a frecuencias altas de estimulación
A. En la izquierda se muestra un Histograma periestimulo de una neurona tipo 1 a una frecuencia de estimulación de 0,5 Hz, véase como la tasa de disparo se mantiene constante a lo largo de los cuatro periodos. A la izquierda una neurona de adaptación rápida a 8Hz de estimulación. Véase la rápida adaptación en los periodos P2, P3, P4. B. El grafico muestra el promedio total de espigas a lo largo de los 4 periodos de estimulación a diferentes frecuencias en capas 2/3 y capas 5/6. Existe una correlación inversa entre número total de espigas y frecuencia de estimulación. Los asteriscos marcan el nivel de significación de la diferencia entre las distintas frecuencias y el control (0,5Hz). *** = $P < 0,001$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$.

en 4 periodos de estimulación de 10 estímulos cada uno, el primer periodo de 10 estímulos fue normalizado al 100% de la respuesta y se comparó con los siguientes 3 periodos de estimulación (Figura 11). A frecuencias bajas de estimulación ($<5\text{Hz}$), las neuronas registradas dispararon espigas de manera uniforme a lo largo del todo el tren, sin embargo, a frecuencias altas (5Hz, 8Hz,

y 10Hz) la tasa de disparo se redujo significativamente a partir del 5 al 6 estímulo hasta que alcanzaron una tasa de disparo estacionaria. Los resultados del análisis estadístico ANOVA indican que ambos factores, frecuencia y tiempo cambian significativamente ($F_{2, 243} = 5,97$; $p=0,0003$). La figura 14 muestra la adaptación de la respuesta de las neuronas de capas 2/3, reduciéndose hasta alcanzar un valor del $28,7 \pm 6,7\%$ ($p<0,01$) de la respuesta cuando la frecuencia de estimulación fue de 5Hz, a 8Hz el valor fue de $13,5 \pm 8,7\%$ ($p<0,001$) y a 10 Hz de $13,0 \pm 6,5\%$ ($p<0,001$), respecto del valor control, además a medida que aumentaba la frecuencia, el tiempo hasta alcanzar la respuesta estacionaria fue mayor.

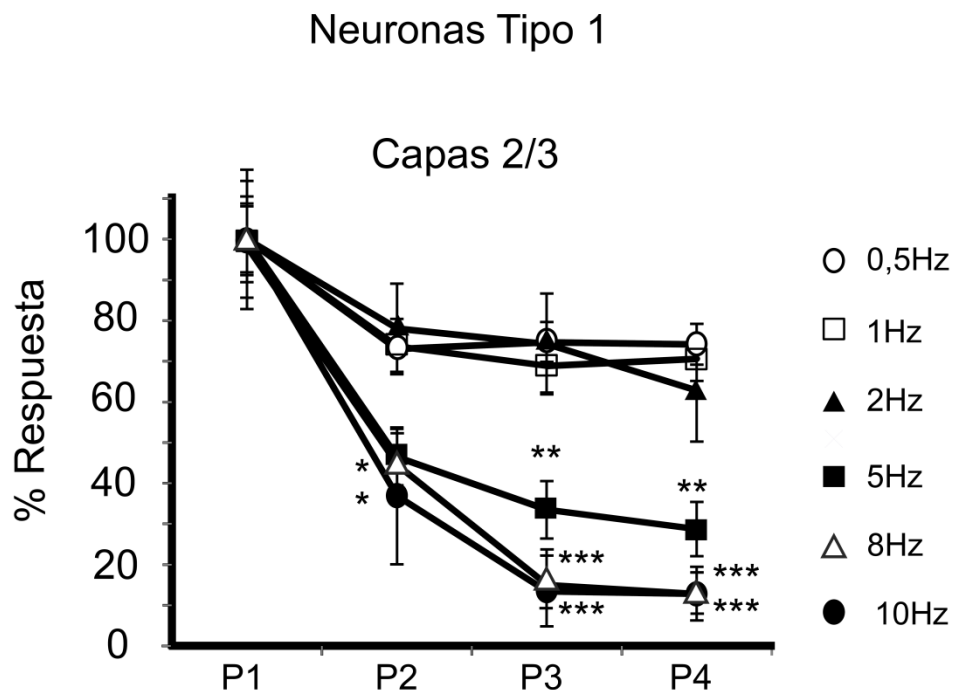


Figura 14. Adaptación de las neuronas corticales tipo 1 de capas 2/3 a diferentes frecuencias de estimulación. A. En la gráfica se muestra el porcentaje de reducción de la respuesta de los periodos P2, P3, P4 respecto al periodo control, P1; 100%) en las neuronas tipo 1 de las capas 2/3. Los asteriscos representan el nivel de significación, *** = $p<0,001$; ** = $p < 0,01$; * $p = < 0,05$.

Las neuronas de capas 5/6 ($n=127$) también mostraron una adaptación gradual de la respuesta a una estimulación repetitiva conforme aumenta la frecuencia de estimulación (0,5 – 10Hz), hasta alcanzar una respuesta estacionaria (Figura 15). Los resultados del análisis estadístico ANOVA, también indica que tanto el tiempo como la frecuencia cambian significativamente ($F_{5, 177} = 7,87$; p

<0,001). Además, la adaptación de la respuesta a una estimulación repetitiva fue ligeramente superior en capas 5/6 que en capa 2/3 a frecuencias alta de estimulación alcanzando un valor de $23,5 \pm 6,1\%$ ($p < 0,05$) a 5Hz, $7,3 \pm 2,1\%$ ($p < 0,001$) a 8Hz y de $3,1 \pm 2,3\%$ ($p < 0,001$) a 10Hz, a frecuencias bajas de estimulación se encontró significación en las diferencias en el periodo 3 y periodo 4 con respecto al periodo control a la frecuencia de estimulación de 2Hz.

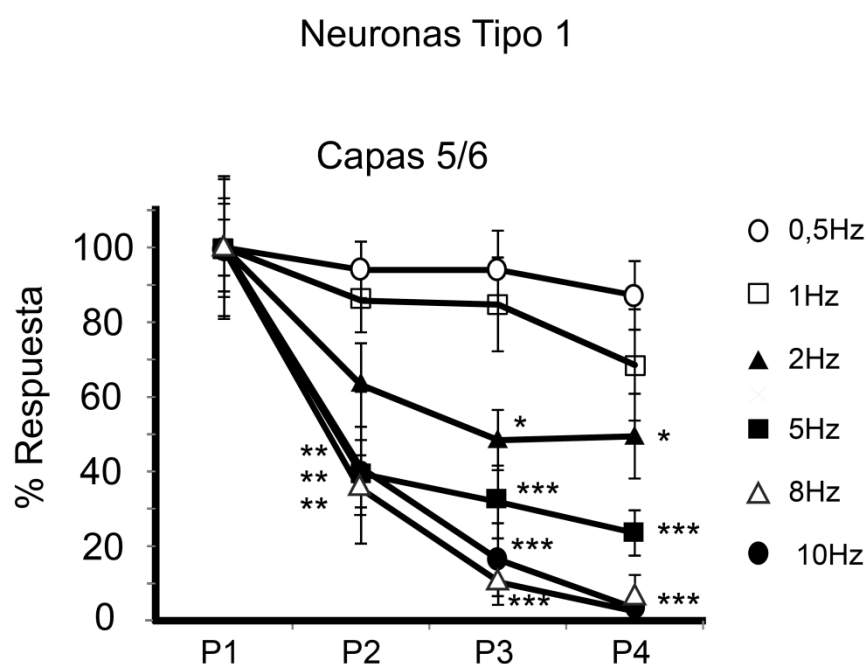


Figura 15. Adaptación de las neuronas corticales tipo 1 de capas 5/6 muestran adaptación a altas frecuencias de estimulación A. En la gráfica se muestra el porcentaje de reducción de la respuesta de los periodos P2, P3, P4 respecto al periodo control, P1; 100%) en las neuronas tipo 1 de las capas 5/6. Los asteriscos representan el nivel de significación, *** = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$

Las neuronas clasificadas como tipo 2 ($n = 15$) no mostraron adaptación de la respuesta a una estimulación repetitiva a 0,5 Hz, 5Hz, y 10 Hz ($F_{2, 126} = 2,26$; $p = 0,116$; Figura 16)

Neuronas tipo 2

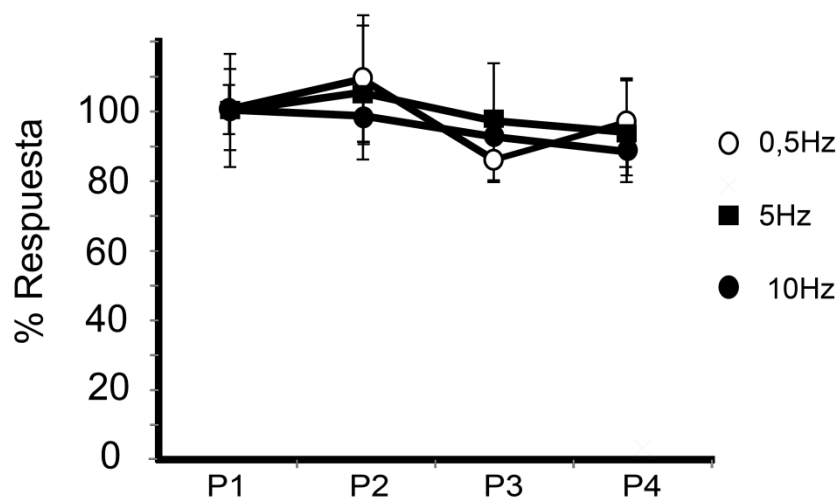


Figura 16. Adaptación de las neuronas corticales tipo 2. En la gráfica se muestra el porcentaje de reducción de la respuesta de los periodos P2, P3, P4 respecto al periodo control P1,

La adaptación de la respuesta encontrada en las neuronas clasificadas como tipo 1 en la corteza puede deberse a depresión de la sinapsis tálamo-cortical (Castro-Alamancos, 2002a). Otra explicación a la rápida adaptación de las neuronas corticales, puede ser debido a un aumento de la inhibición mediada por células inhibitorias, ya que estas no muestran adaptación de la respuesta a una estimulación repetitiva. Para analizar esta hipótesis, se aplicó un agonista de los receptores GABA_A (Muscimol; Figura 17A) mediante inyección intracortical dirigida a capa 2/3 o capas 5/6 cerca del sitio registro, usando una jeringa Hamilton (0,1 μ l, 8 mM).

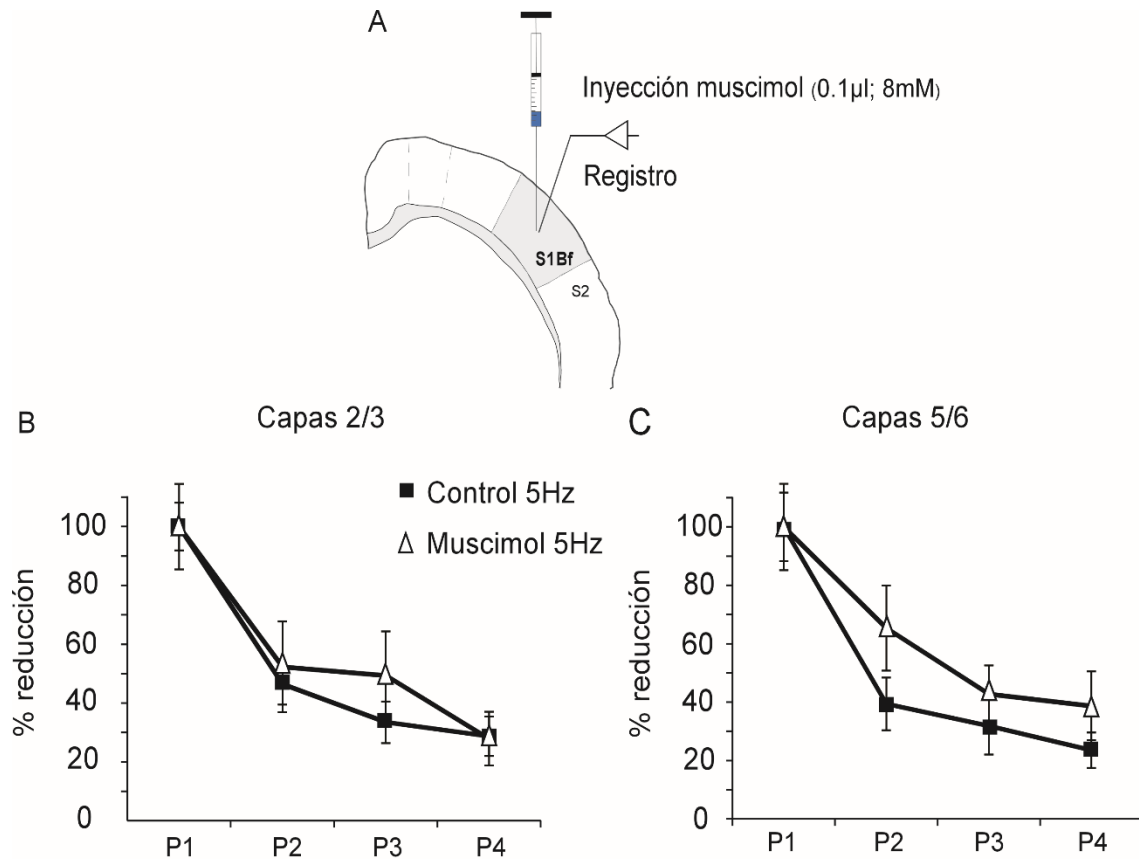


Figura 17. La aplicación local de muscimol no modificó la adaptación de la respuesta en neuronas corticales. A. Esquema anatómico de la inyección. B. En el gráfico se muestra la respuesta de las neuronas corticales tipo 1 de las capas 2/3 a la estimulación de las vibras durante los cuatro periodos, antes (control) y después de la aplicación de muscimol. C. Neuronas de capa 5/6 a la estimulación de las vibras antes (control) y después de la aplicación de muscimol. Nótese que no existen diferencias significativas en capas 2/3 ni capas 5/6 en P4 antes y después de la aplicación de muscimol. S1Bf: corteza somestésica primaria, región de barriles, S2 corteza somestésica secundaria.

La actividad espontanea tras la aplicación de Muscimol, se redujo de 1,4 espigas/segundo en control a 0,7 espigas/segundo en capa 2/3 y de 1,3 espigas/segundo a 0,8 espigas/estímulo en capas 5/6. En estas condiciones la adaptación de la respuesta fue similar tanto en capas 2/3 ($F_{1, 108} = 0,37$; $p = 0,545$), como en capas 5/6 ($F_{1,102} = 0,76$; $p = 0,388$), respecto de sus valores control (sin Muscimol), por tanto, estos datos sugieren, que un aumento de la inhibición no estaría afectando a la adaptación de la respuesta ante un estímulo repetitivo (Figura 17B y C).

4.2 Adaptación de la respuesta en estructuras subcorticales

Para determinar si la adaptación de la respuesta encontrada en las neuronas corticales viene impuesta por una reducción de los inputs aferentes desde el núcleo ventral postero-medial del tálamo (VPM) o del núcleo principal del trigémino (Pr5), y respondiendo por tanto al objetivo 1.b y 1.c, se registraron neuronas en ambas estructuras y se aplicó un tren de 40 estímulos idéntico al utilizado en corteza, a una frecuencia 0,5Hz control, y de 5Hz, frecuencia a la cual las neuronas corticales muestran una rápida adaptación.

Las neuronas registradas en el núcleo VPM ($n = 25$) mostraron una baja actividad espontánea ($1,2 \pm 0,4$ espigas/segundo, y la respuesta media fue de 0,9 espigas/estímulo, con una latencia media de 12 ± 1 ms. En el núcleo Pr5 las neuronas registradas ($n= 27$) tuvieron una tasa de disparo en actividad espontánea de $0,8 \pm 0,3$ espigas/segundo, y respondieron $1,23 \pm 0,1$ espigas/estímulo cuya latencia media fue de 10 ± 1 ms. A baja frecuencia de estimulación (0,5 Hz) la adaptación de la respuesta fue de un 2 % en el núcleo VPM, respecto del valor control del primer periodo de estimulación (Figura 18A). En las neuronas del núcleo Pr5, la adaptación fue menor de un 5% (Figura 18B). Sin embargo, la adaptación aumento significativamente en ambas estructuras cuando se aumentó la frecuencia de estimulación a 5Hz. El análisis ANOVA mostró diferencias significativas entre 0,5 Hz y 5Hz tanto en VPM ($F_{1, 108} = 19,11$; $p = 0,001$) como en Pr5 ($F_{1, 150} = 4,07$; $p = 0,049$). La adaptación de la respuesta aumento hasta alcanzar un 55% de la respuesta control (entre el 4^{to} periodo y el 1^{ro}) en el núcleo VPM, cuando la frecuencia de estimulación aumento a 5Hz ($p < 0,001$) y hasta un 25% de la respuesta en Pr5 ($p < 0,05$; Figura 18A, B. Por tanto, la adaptación de la respuesta fue mayor en corteza que en estructuras subcorticales, y mayores en VPM que en Pr5, es decir, a medida que ascendemos en la vía lemniscal, la adaptación de la respuesta es mayor.

Resultados

Para determinar la influencia de las proyecciones cortico-fugales a la adaptación de la respuesta en estructuras subcorticales, se registró nuevamente tanto en VPM y Pr5, se estudió la respuesta a un estímulo repetitivo, tras enfriar la corteza de forma reversible para producir su inactivación.

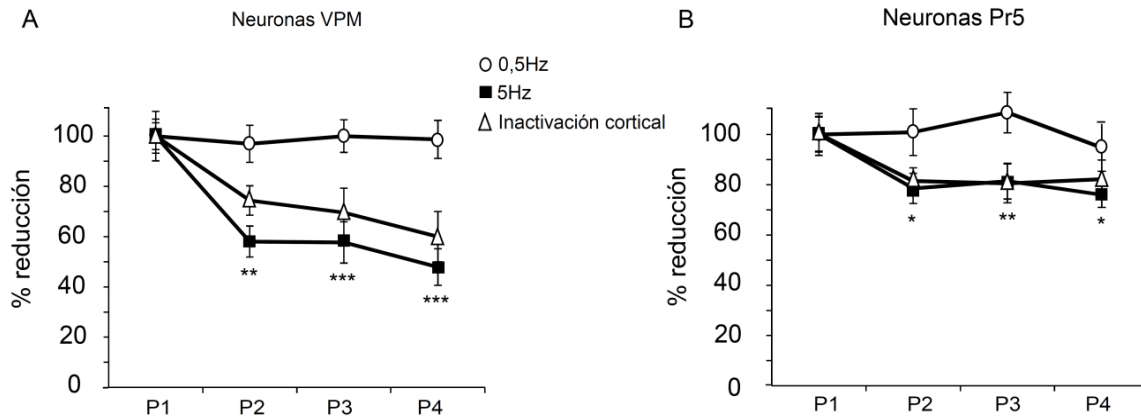


Figura 18. Adaptación de la respuesta táctil en VPM y Pr5. A. Gráfica de la adaptación de la respuesta a un estímulo repetitivo en neuronas talámicas del núcleo. La adaptación a la frecuencia de estimulación a 5Hz fue menor que en las neuronas corticales tipo 1, Además la inactivación cortical mediante frío, no modificó significativamente la adaptación. B. Se muestra la misma gráfica para neuronas registradas en el núcleo Pr5. La adaptación de la respuesta fue menor en este núcleo que en VPM y en la corteza. Además, la inactivación cortical no afectó a la adaptación encontrada a 5Hz sin inactivación. En este caso los asteriscos indican diferencias significativas respecto a 0,5 Hz. Pr5: Núcleo principal del trigémino, VPM: Núcleo ventral postero-medial del tálamo.

En este caso la inactivación cortical redujo la respuesta (de $3,2 \pm 0,4$ a $1,6 \pm 0,3$ espigas/estímulo; $n = 12$; $p = 0,002$) en VPM, así como en Pr5 (de $2,8 \pm 0,2$ a $1,9 \pm 0,3$ espigas/estímulo; $n = 18$; $p = 0,01$). Sin embargo, la actividad espontanea no se vio afectada por la inactivación cortical, ni en el núcleo VPM, ni en el núcleo Pr5. En estas condiciones, las neuronas de VPM, mostraron una adaptación de la respuesta similar a las condiciones control (5Hz sin inactivación cortical), adaptando hasta un 60% en el 4^{to} periodo de estimulación (frecuencia de estimulación 5Hz; Figura 18A). El análisis ANOVA indica que las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($F_{1, 69} = 0,61$; $p = 0,442$). En el núcleo Pr5 ocurrió algo similar, las neuronas de Pr5 adaptaron hasta un

82% similar a la situación control, al igual que en el caso anterior el análisis ANOVA indicó que las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre 5Hz en situación control, y 5Hz tras inactivación cortical ($F_{1, 123} = 0,06$; $p = 0,8$; Figura 18B). Estos datos junto a los mostrados en la corteza sugieren que la adaptación no es exclusivamente debida a mecanismos subcorticales, sino que depende adicionalmente de mecanismos intrínsecos a la corteza.

4.3 Modulación colinérgica de la adaptación de la respuesta

Los niveles de acetilcolina (ACh) en la corteza cambian acorde al ciclo sueño-vigilia o al nivel atencional (Jasper y Tesser, 1971; Sarter et al., 2014). Puesto que la adaptación puede estar implicada en el procesamiento sensorial, hemos estudiado el efecto producido por la aplicación de ACh en la adaptación de la respuesta de las neuronas corticales a un estímulo repetitivo en las vibrisas, dando respuesta al objetivo 1.d. Para ello, se inyectó ACh (0,1 μ l; 10 μ M) a través de una jeringa Hamilton (Figura 19A). La aplicación de ACh produjo un aumento de la actividad espontánea de $0,4 \pm 0,3$ espigas/segundo a $2,3 \pm 0,6$ espigas/segundo en capas 2/3 ($n = 25$; $p < 0,001$) así como en capas 5/6 (de $0,5 \pm 0,2$ espigas/segundo a $1,1 \pm 0,4$ espigas/segundo; $n = 31$; $p = 0,0015$).

La respuesta a la estimulación de las vibrisas aumentó de $0,8 \pm 0,1$ a $1,1 \pm 0,1$ espigas/estímulo ($n = 25$; $p = 0,02$) y de $0,7 \pm 0,1$ a $1 \pm 0,2$ espigas/estímulo ($n = 31$; $p = 0,03$) en neuronas de las capas 2/3 y capas 5/6 respectivamente. Sin embargo, la latencia de la respuesta no cambió ni en capas 2/3 ($15 \pm 1,0$ ms) ni en capas 5/6 ($16 \pm 1,0$ ms).

En presencia de ACh en la corteza de barriles, la adaptación de la respuesta en neuronas clasificadas como tipo 1 disminuyó a 5Hz, respecto a los valores control. El análisis ANOVA indicó que las diferencias fueron significativas en capas 2/3 ($F_{1, 126} = 6,58$, $p = 0,014$) y en capas 5/6 ($F_{1, 93} = 11,73$, $p = 0,002$; Figura 19B y Figura 20, respectivamente).

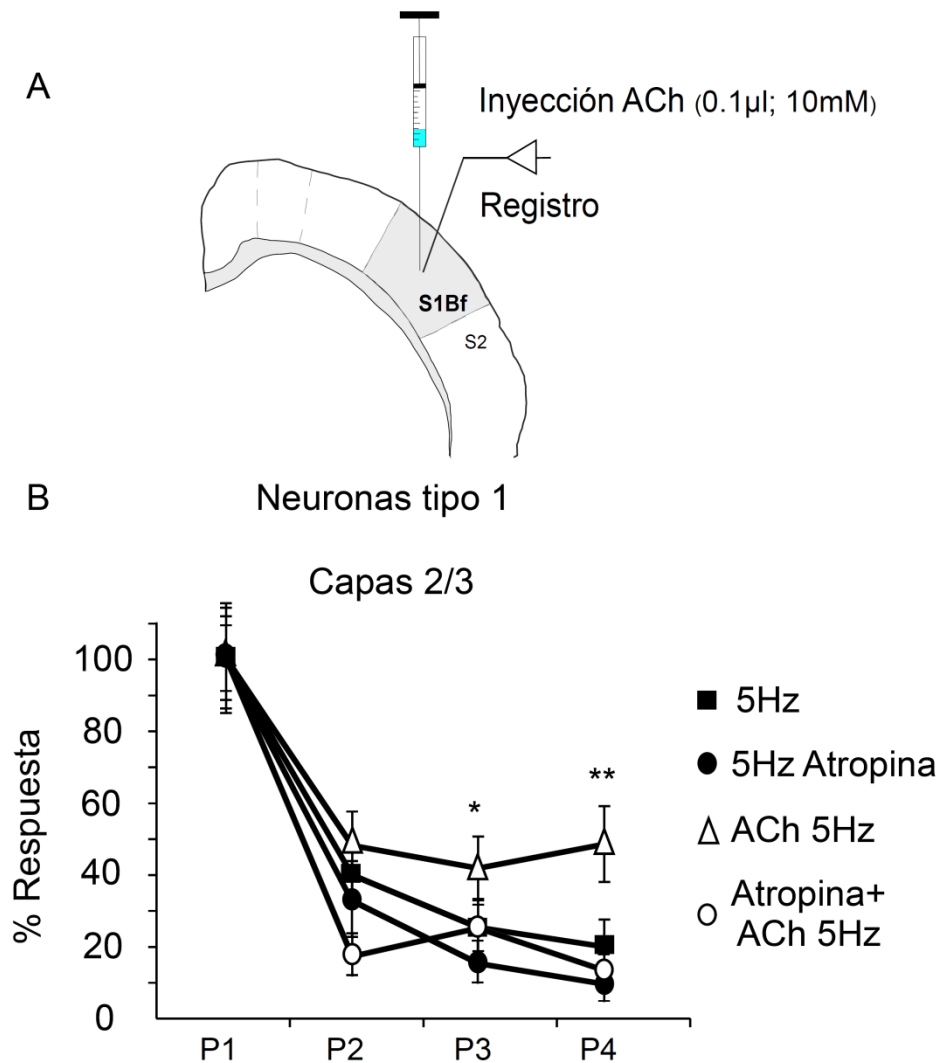


Figura 19. La aplicación de ACh (0,1 µl, 10 µM) en capas 2/3 de la corteza de barriles, reduce la adaptación de la respuesta en neuronas tipo 1. A. Esquema anatómico de la zona de inyección y registro. B. La inyección de atropina (1 mg/kg, i.p.), no modifica la adaptación de la respuesta por sí misma. Sin embargo, si es capaz de bloquear el efecto de la aplicación de ACh sobre la adaptación de la respuesta, lo que sugiere, que el efecto colinérgico sobre la adaptación podría estar mediado por activación de receptores muscarínicos. ACh: Acetilcolina, S1Bf Corteza somestésica primaria región de barriles. S2: corteza somestésica primaria.

En presencia de ACh las neuronas tipo 1 de capas 2/3 alcanzaron un valor estacionario del 56% de respecto de la respuesta inicial en el segundo periodo de estimulación que se mantuvo constante hasta el cuarto periodo mientras que en condiciones control, la adaptación de la respuesta siguió aumentando tanto el tercer periodo como en el cuarto periodo, llegando a un valor estacionario del 29% de la respuesta inicial en el cuarto periodo ($p < 0,001$, entre el 4^{to} periodo en control y en presencia de ACh, estimulados a 5Hz; Figura 19B). Las neuronas de capas 5/6 también mostraron una reducción de la adaptación de la respuesta a una estimulación repetitiva en presencia de ACh, alcanzando una reducción de hasta un 60% de la respuesta inicial ($p < 0,01$, entre el 4^{to} periodo en control y el 4^{to} periodo en presencia de ACh Figura 20)

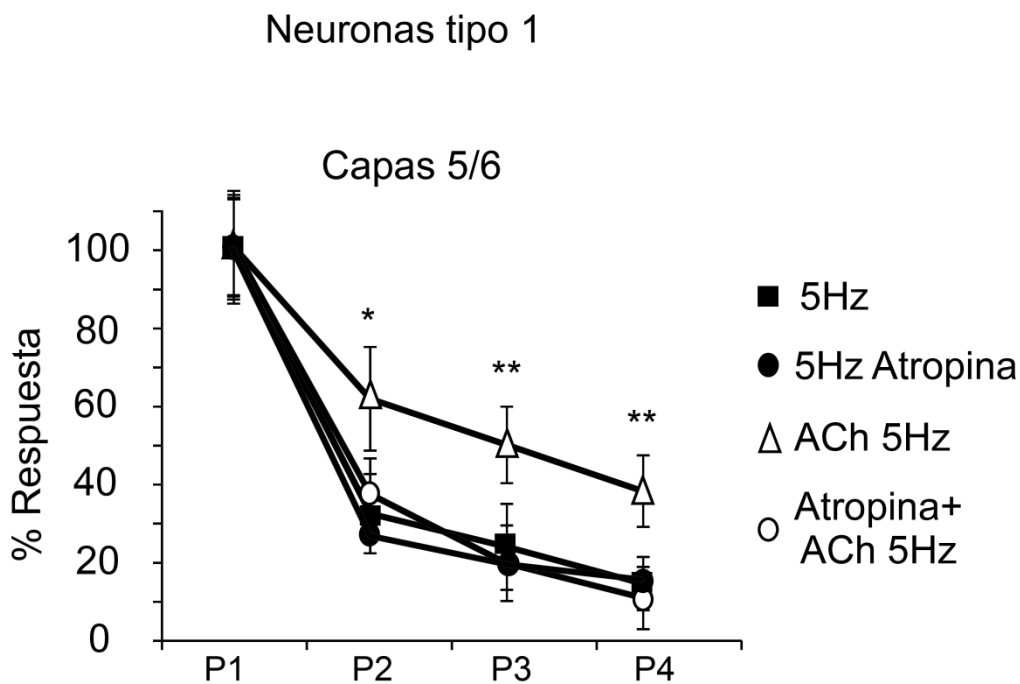


Figura 20. La aplicación de ACh (0,1 μ l, 10 μ M) en capas 5/6 de la corteza de barriles, reduce la adaptación de la respuesta en neuronas tipo 1. La inyección de atropina (1 mg/kg, i.p.), no modifica la adaptación de la respuesta por sí misma. Sin embargo, si es capaz de bloquear el efecto de la aplicación de ACh sobre la adaptación de la respuesta, lo que sugiere, que el efecto colinérgico sobre la adaptación podría estar mediado por activación de receptores muscarínicos. ACh: Acetilcolina

Las neuronas clasificadas como tipo 2 no modificaron la adaptación a la respuesta en presencia de ACh ni en capas 2/3 ni en capas 5/6 (Figura 21).

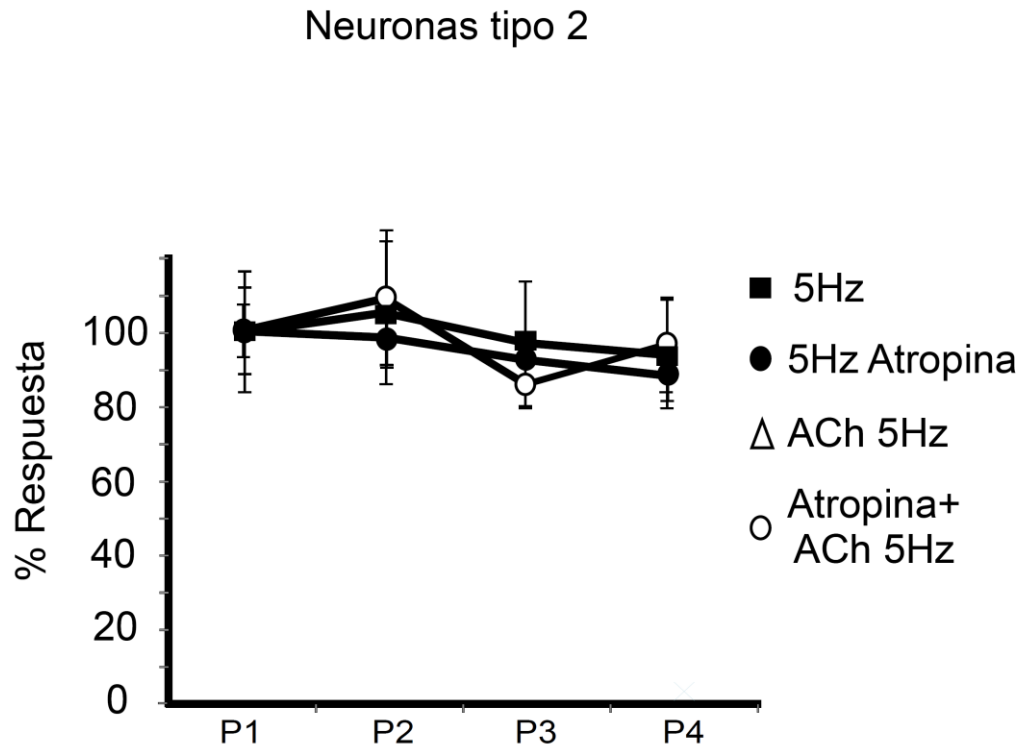


Figura 21. La ACh no modifica la adaptación de las neuronas tipo 2. En contraposición a lo que ocurre en las neuronas tipo 1, ACh o Atropina no modifica la adaptación de la respuesta de las neuronas tipo 2. En este caso los asteriscos indican diferencias respecto a la estimulación a 5 Hz en condiciones control. ACh: Acetilcolina

Para comprobar si la reducción de la adaptación mediada por ACh fue debida a activación de receptores muscarínicos, se inyectó atropina (1mg/kg, i.p.) 10 minutos antes de la inyección intracortical de ACh en capas 2/3 y capas 5/6. En presencia de atropina, la respuesta fue de $0,5 \pm 0,1$ espigas/estímulo con una latencia media de 15 ± 1 ms en capas 2/3 y $0,7 \pm 0,1$ espigas/estímulo con una latencia media de 14 ± 1 ms, en capas 5/6. Además, la atropina bloqueó el efecto de la ACh sobre la adaptación de la respuesta tanto en capas 2/3 como en capas 5/6 de la corteza de barriles. La adaptación de la respuesta alcanzó en el cuarto periodo el 19% de la respuesta en capas 2/3 (Figura 19B) y 20% en capas 5/6 (Figura 20). Los resultados del análisis ANOVA indican que no existen diferencias significativas en la adaptación de la respuesta, cuando la atropina fue inyectada intraperitonealmente, ($F_{1, 96} = 0,74$; $p = 0,396$), o cuando la ACh fue administrada en presencia previa de atropina ($F_{1,102} = 0,0$; $p = 0,96$) con respecto a los valores control. En capas 5/6 el efecto fue similar, no hallándose diferencias significativas entre la condición de inyección intraperitoneal de atropina ($F_{1, 81} = 0,35$; $p = 0,56$) o la administración de ACh cuando previamente se ha inyectado atropina ($F_{1,75} = 0,02$; $p = 0,887$), respecto de los valores control.

Para profundizar más acerca del efecto de la ACh sobre la adaptación de la respuesta en las neuronas corticales, se analizó la respuesta media y la latencia de los 10 estímulos del primer periodo uno a uno (P1). La respuesta media y la latencia del primer estímulo fueron similares a los valores control (sin ACh) tanto en capas 2/3 como en capas 5/6. Sin embargo, la respuesta media por estímulo se mantuvo más elevada en los sucesivos 9 estímulos, tanto en capas 2/3 como en capas 5/6 (Figura 21A y 22A). Además, la administración de ACh redujo significativamente la latencia de los estímulos 2-5 respecto a los valores control (5Hz sin ACh) en capas 2/3 (Figura 22B) mientras que en capa 5/6 esta reducción duro hasta el estímulo 8 (Figura 23B). El efecto colinérgico observado en estos primeros estímulos, fue bloqueado por la administración i.p. previa de atropina, no observándose diferencias en capas 2/3 (Figura 22) ni en capas 5/6 (Figura 23) respecto a los valores control (5Hz sin ACh), lo que sugiere que el efecto colinérgico sobre la respuesta a los primeros estímulos del tren, estaría mediado por receptores muscarínicos

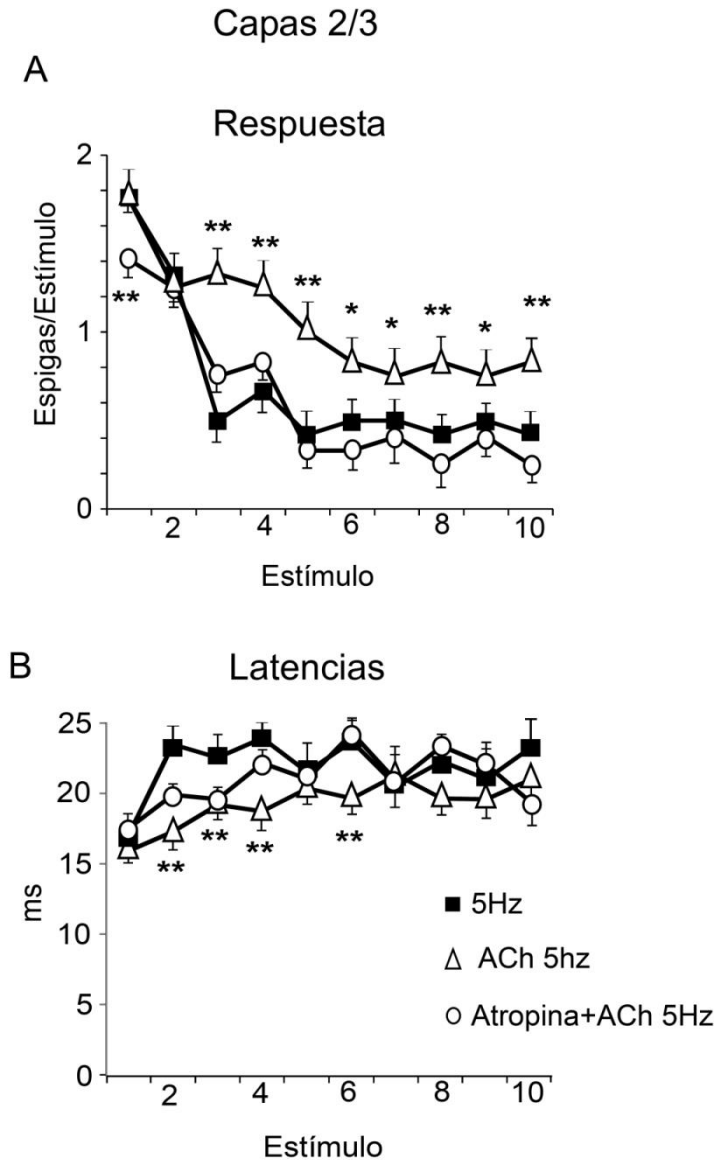


Figura 22. Respuesta de las neuronas de corteza de barriles de capas 2/3 durante el primer periodo de estimulación. Respuesta de las neuronas de corteza de barriles de capas 2/3 en control (5Hz), en presencia de ACh (0,1 μ l, 10 μ M) o en presencia de Atropina+ACh (1mg/1kg, i.p. y 0,1 μ l, 10 μ M respectivamente). A. La grafica muestra la respuesta media en los primeros 10 estímulos. La respuesta en presencia de ACh fue similar a las condiciones control en el estímulo 1(5Hz), o cuando previamente se han bloqueado los receptores muscarínicos con atropina, pero redujo significativamente la adaptación de la respuesta en los 9 estímulos siguientes en comparación con el control (5Hz) o en presencia previa de atropina. B. En la gráfica se muestra las latencias de las respuestas de los 10 primeros estímulos del periodo 1, La latencia fue menor en presencia de ACh, que en la condición control (5Hz) o cuando la atropina fue inyectada previamente. Los asteriscos representan las diferencias significativas en comparación con la estimulación control (5Hz). ACh: Acetilcolina.

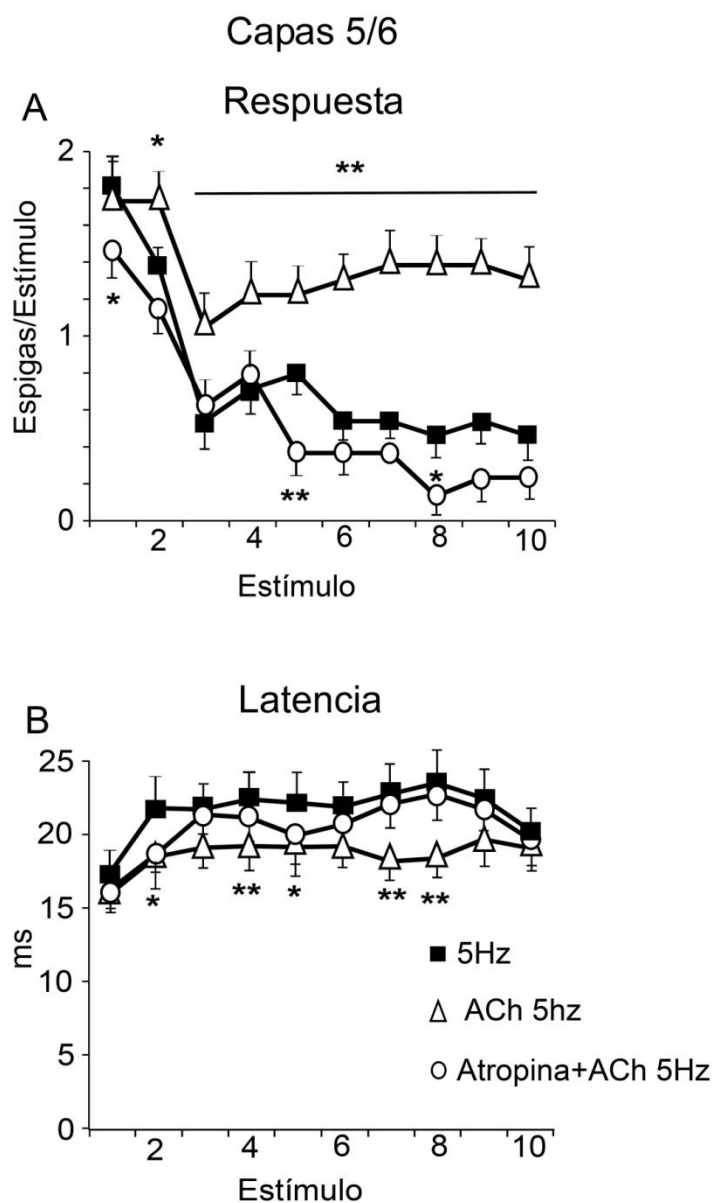


Figura 23. Respuesta de las neuronas de corteza de barriles de capas 5/6 durante el primer periodo de estimulación. Respuesta de las neuronas de corteza de barriles de capas 2/3 en control (5Hz), en presencia de ACh (0,1 μ l, 10 μ M) o en presencia de Atropina+ACh (1mg/1kg, i.p. y 0,1 μ l, 10 μ M respectivamente). A. La grafica muestra la respuesta media en los primeros 10 estímulos. La respuesta en presencia de ACh fue similar a las condiciones control en el estímulo 1(5Hz), o cuando previamente se han bloqueado los receptores muscarínicos con atropina, pero redujo significativamente la adaptación de la respuesta en los 9 estímulos siguientes en comparación con el control (5Hz) o en presencia previa de atropina. B. En la gráfica se muestra las latencias de las respuestas de los 10 primeros estímulos del periodo 1, La latencia fue menor en presencia de ACh, que en la condición control (5Hz) o cuando la atropina fue inyectada previamente. Los asteriscos representan las diferencias significativas en comparación con la estimulación control (5Hz). ACh: Acetilcolina.

Como se ha demostrado en los resultados anteriores existe una relación inversa entre la frecuencia de estimulación y la tasa de disparo de las neuronas, produciendo adaptación de la respuesta de las neuronas cuando se presenta un estímulo idéntico que se repite en el tiempo y, además, la adaptación es más pronunciada a medida que se asciende en las estructuras de la vía lentiscal. La adaptación es un proceso importante para el procesamiento sensorial. Si bien se han sugerido diversos mecanismos por los cuales puede darse este fenómeno, han surgido nuevas propuestas acerca del papel que ejercen otras cortezas asociativas en el procesamiento sensorial. Si bien, existen diversas estructuras que podrían estar regulando el flujo de información sensorial, la corteza prefrontal está situada en una posición privilegiada por su conectividad anatómica y el ampliamente demostrado papel de la corteza prefrontal en la función ejecutiva, además ha sido propuesto por algunos autores como área clave en el control en el control talámico de la información sensorial, y por tanto la atenuación de estímulos irrelevantes, suprimiendo los distractores, proceso que es clave para la focalización atencional (Zikopoulos y Barbas, 2006; Zikopoulos y barbas., 2007; Du y Yansen, 2011; Wimmer et al., 2015; Barbas y Garcia-Cabezas, 2016). Si bien, aunque esta cuestión está en debate, sería esperable que la corteza prefrontal reciba información sensorial a través de conexiones cortico-corticales, o a través de conexiones tálamo-corticales para poder llevar a cabo estas funciones.

Por tanto, para dar respuesta al objetivo 2 de la presente Tesis determinar si existe información sensorial en la corteza prefrontal cuando se estimulan directamente las vibrisas.

La literatura anatómica demuestra importantes conexiones entre cortezas sensoriales y regiones dorsales de la corteza prefrontal medial (Hoover y Vertes 2007; Bedwell et al., 2015) además, Golmayo et al., 2003 reportan datos electrofisiológicos acerca de esta conectividad. Para confirmar la existencia de respuesta unitaria en la corteza prefrontal, se estimuló la corteza somatosensorial, S1/S2 mediante 40 estímulos eléctricos (20-100 μ A) y se registró la actividad unitaria en corteza prefrontal medial (Figura 24A, B) encontrándose una importante actividad en regiones dorsales de la corteza

prefrontal medial, concretamente en corteza cingular anterior, la respuesta media fue de $1,34 \pm 0,17$ espigas/estímulo, y la latencia inicial media fue 15 ± 2 ms; en la Figura 24 se muestra la de actividad unitaria generada en corteza prefrontal dorsal por estimulación eléctrica de la corteza S1, que sugiere la presencia de espigas ortodrólicas, dada la ventana de actividad de tiempo de disparo (bin 1ms) además hubo fallos en el disparo a lo largo del periodo de estimulación, lo que sugiere que existen aferencias somatosensoriales a la corteza prefrontal medial, y que en parte la información sensorial que llega a la corteza prefrontal medial, tiene como estación de paso la corteza S1,

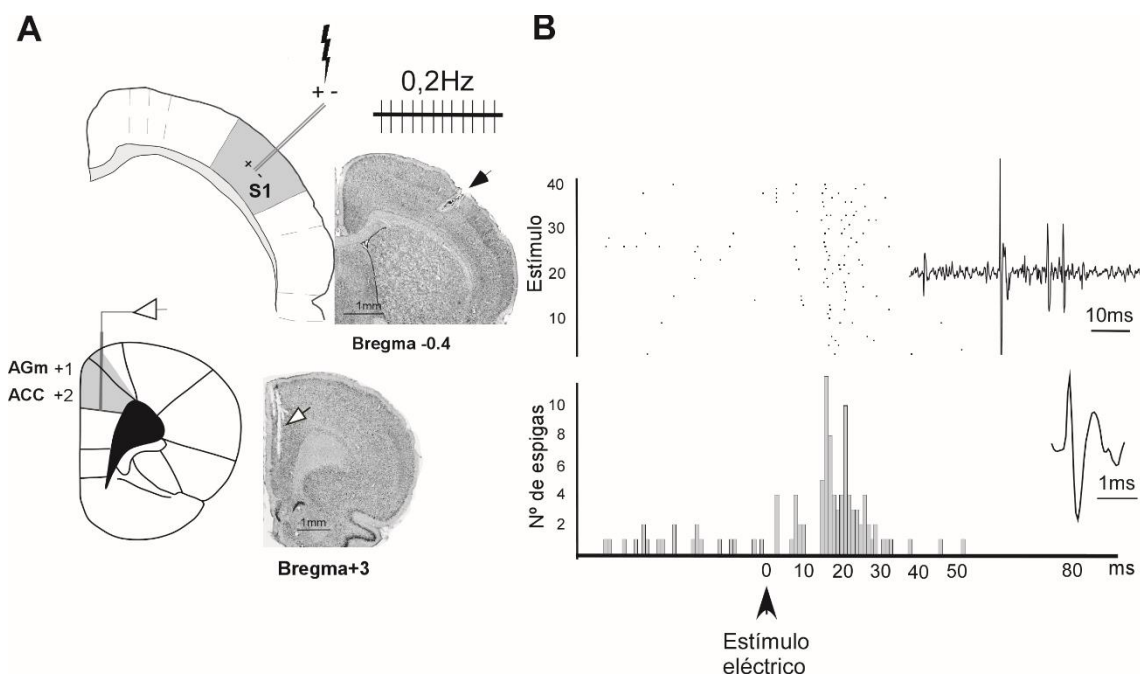


Figura 24. La estimulación eléctrica de la corteza S1 evoca actividad en regiones dorsales de la corteza prefrontal. A. ilustración anatómica del sitio de registro en corteza prefrontal, y de estimulación en corteza somestésica. En las imágenes insertadas se muestra el trayecto del electrodo de registro y de estimulación. B. Histograma periéstímulos en corteza prefrontal. El trazo insertado corresponde a un ejemplo representativo de un estímulo eléctrico y las espigas generadas. Abajo a la derecha se muestra un ejemplo de espiga generada por estimulación eléctrica. ACC: corteza cingular anterior, AGm: corteza agranular medial, S1: corteza somestésica primaria.

Con el objetivo de realizar una estimulación más fisiológica, se estimularon las vibrisas mediante 60 pulsos de aire de 20 ms de duración, 15° en retracción. Sin embargo, no se encontraron respuestas unitarias fásicas, a la estimulación mediante un pulso de aire de una vibrisa, si bien tampoco existen datos en la

literatura, acerca de respuestas unitarias en corteza prefrontal medial, mediante el movimiento mecánico directo de una vibrisa en corteza prefrontal medial, bajo anestesia con uretano. Pero se detectó que la estimulación de las vibrisas genera un aumento de la frecuencia media en la actividad espontánea multiunitaria en corteza PL (4.62 espigas/segundo, sin estimulación, a 5.43 espigas/segundo durante la estimulación de las vibrisas, $p = 0.013$).

El potencial evocado somestésico consistió en una onda con un primer componente negativo, seguido de un segundo componente positivo. Para los siguientes análisis se utilizó el primer componente de negativo del PES y del PEA, ya que tanto la latencia como la duración fueron más precisas y estables (ver materiales y métodos). Como se aprecia en la Figura 25B, los PESs de las regiones dorsales, AGm y AC, tuvieron una latencia al pico más corta que los PESs registrados en PL ($p < 0.001$) e IL ($p < 0.001$; Figura 25B; Tabla 1). Sin embargo las cuatro regiones de la corteza prefrontal tuvieron una latencia al pico mayor que los PESs registrados en corteza S1 (AGm, $p = 0.009$; ACC, $p = 0.01$; PL, $p < 0.001$; IL, $p < 0.001$; Tabla 1). Aunque las diferencias no fueron significativas, se aprecia una mayor amplitud al pico, en regiones ventrales de la corteza prefrontal, tanto en PL e IL, sin embargo fueron mucho menores en todas las áreas que la amplitud registrada en S1 ($p < 0.001$). Dado que las características de los PESs registrados en corteza AGm y corteza ACC fueron similares, los registros en ambas estructuras se agruparon para posteriores análisis, a partir de lo cual para AGm y ACC nos referiremos en las figuras como AGm-ACC (Figura 25B).

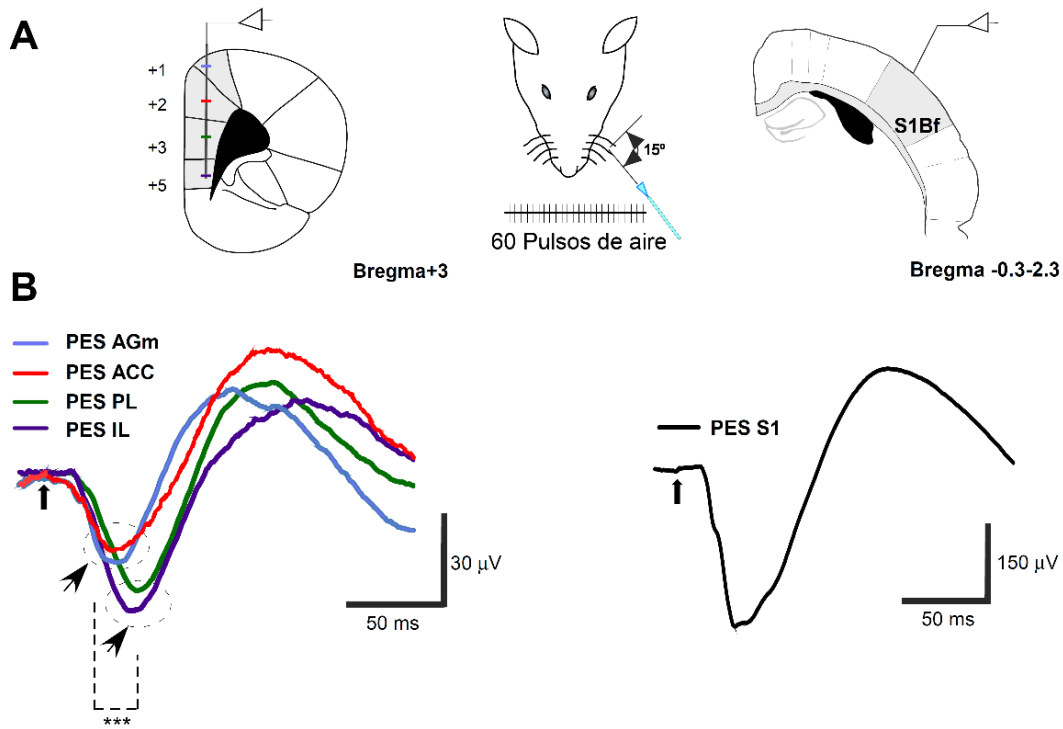


Figura 25. Potenciales evocados somatosensoriales en CPFm. A. Ilustración esquemática anatómica de la zona de registro en CPFm, y S1, la imagen insertada corresponde al protocolo de estimulación utilizado. B. Gran promedio ($n = 5$ ratas) de los potenciales evocados somestésicos registrados en CPFm a la izquierda, y en S1 a la derecha. Los asteriscos representan la diferencia significativa entre los potenciales evocados registrados en AGm y ACC respecto de PL ($p < 0,001$) e IL ($p < 0,001$). ACC: corteza cingular anterior, AGm: corteza agranular medial, IL: corteza infralímbica, PES: potencial evocado somestésico, PL: corteza prelímbica.

También se registraron los PEAs en las cuatro estructuras de la corteza prefrontal medial, evocados mediante un clic de sonido (60 estímulos de 1 ms de duración, 1Hz). En general los PEAs tuvieron una amplitud menor que los PESs registrados en CPFm (Figura 26B), especialmente en la región más dorsal, AGm ($p < 0,001$, en todos los casos; Tabla 1). Esta baja amplitud respecto a los PESs, puede ser debida a una duración menor del click (1ms), que el pulso de aire en las vibrisas (20ms). La latencia al pico de los PEAs en CPFm fue mayor en comparación con los PESs en las mismas áreas, excepto en PL (AGm, $p = 0,009$; ACC, $p = 0,01$; PL, $p = 0,35$; IL, $p < 0,001$; Tabla 1) y significativamente menor que los de A1.

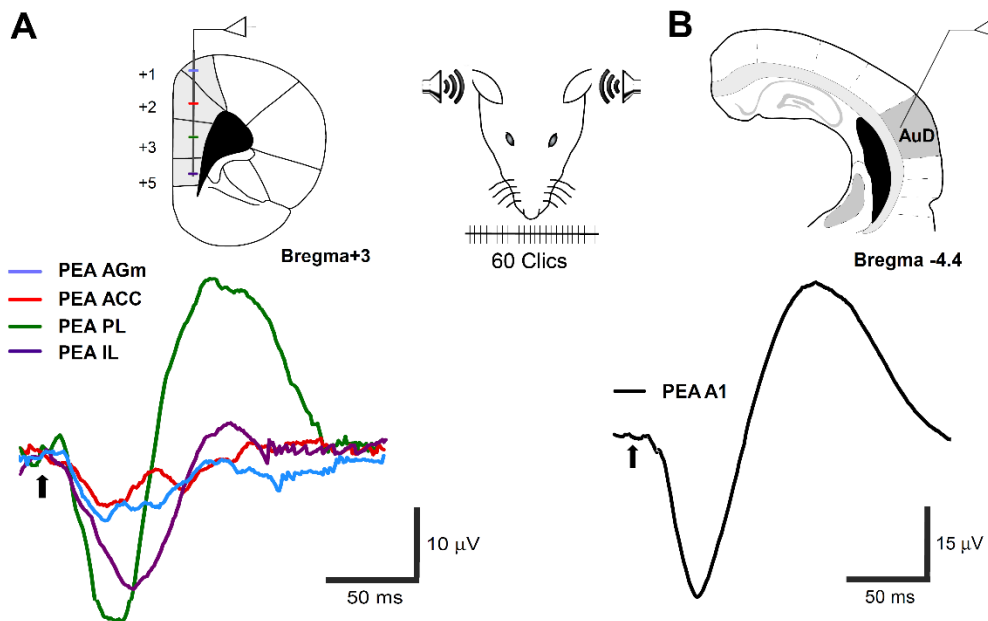


Figura 26. Potenciales evocados auditivos en la CPFm. A. Ilustración esquemática anatómica de la zona de registro en CPFm, y A1, la imagen insertada corresponde al protocolo de estimulación utilizado. B. Gran promedio ($n = 5$ ratas) de los potenciales evocados somestésicos registrados en CPFm a la izquierda, y en A1 a la derecha. AuD: corteza auditiva, ACC: corteza cingular anterior, AGm: corteza agranular medial, IL: corteza infralímbica, PEA: potencial evocado auditivo, PL: corteza prelímbica.

Para determinar si la corteza corteza prefrontal medial es capaz de responder a diferentes frecuencias de estimulación, al igual que vimos en las distintas estructuras de la vía lemniscal, se estimularon 60 veces las vibrisas a diferentes frecuencias (0,5Hz, 1Hz, 2Hz y 5Hz) y se calculó la amplitud al pico del potencial evocado tanto auditivo como somestésico, en corteza prefrontal y en cortezas S1 y A1 (60 estímulos en cada frecuencia, caso representativo, figura27A)

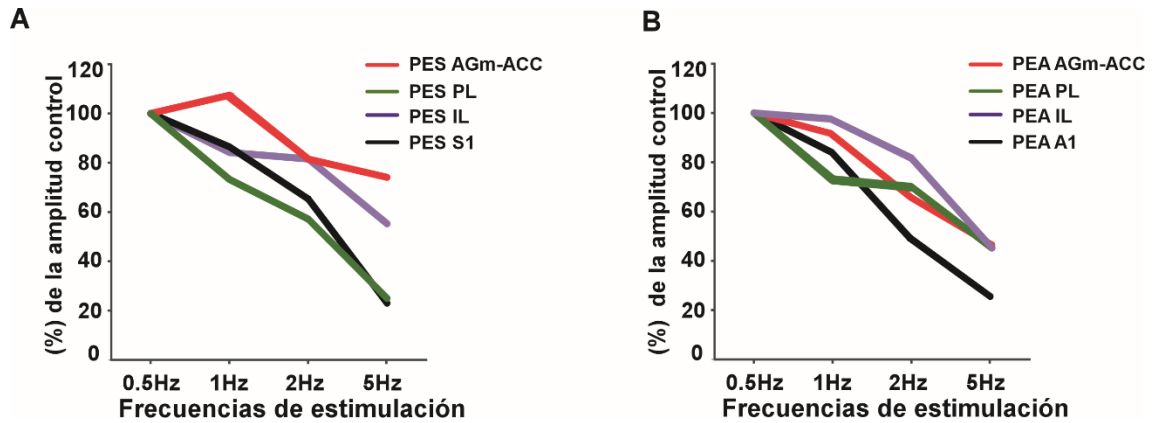


Figura 27. Gráfica de los porcentajes de cambio de la amplitud al pico conforme aumenta la frecuencia de estimulación. 0,5Hz = (control) de los PESs y los PEAs registrados en CPF (AGm-ACC, PL, e IL) y en S1 a diferentes frecuencias de estimulación (n = 1 rata). La amplitud se reduce conforme aumenta la frecuencia de estimulación. A1: corteza auditiva primaria, AGm-ACC: agrupación de resultados de corteza agranular medial y corteza cingular anterior, IL: corteza infralímbica, PES: potencial evocado somestésico, PL: corteza prelímbica, S1: corteza somestésica primaria.

Como se aprecia en la Figura 27A existe un decremento de la respuesta conforme aumenta la frecuencia de estimulación. En todas las estructuras de la CPFm así como en S1, existe una reducción mayor de la amplitud del potencial evocado cuando la frecuencia de estimulación alcanza los 5Hz, frecuencia a la cual vimos anteriormente que provocaba una importante adaptación de la respuesta en capas 2/3 y capas 5/6 de la corteza de barriles (Figuras 14 y 15).

| Área Cortical | Latencia (ms); n= 12 | Amplitud (μV); n= 12 | Latencia (ms); n= 12 | Amplitud (μV); n= 12 |
|---------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| S1/A1 | PES: 34.9±1,1 | PES: 271±39 | PEA: 38.2±1 | PEA: 30,1±8.5 |
| AGM | PES: 41,3±2.8 | PES: 34.7±6 | PEA: 61±3.3 | PEA: 2.6±0,5 |
| aCC | PES: 39±1,9 | PES: 33.4±5 | PEA: 56±4.3 | PEA: 6.3±1,5 |
| PL | PES: 49.1±1 | PES: 37±4.9 | PEA: 44±2.6 | PEA: 18.3±1,2 |
| IL | PES: 46±2 | PES: 47.1±5.5 | PEA: 55±1,6 | PEA: 10,5±1,2 |

Tabla 1, Valores de los potenciales evocados somestésicos y auditivos por estimulación de las vibras o por clic registrados en CPFm, S1 y A1. A1: Corteza auditiva primaria, ACC: corteza cingular anterior, AGM: Corteza agranular medial, IL: Corteza infralímbica, PL: corteza prelímbica. S1: Corteza somestésica primaria

Además, la amplitud al pico de los PEAs se reduce conforme aumenta la frecuencia de estimulación, siendo especialmente notable a la frecuencia de 5Hz, tal y como ocurría en los PESs (60 estímulos, en cada frecuencia, caso representativo, Figura 27B). En los siguientes experimentos se calculó el área de la curva del primer componente del potencial evocado, para cuantificar cambios en la amplitud y duración del mismo (ver también materiales y métodos), estando encuadrados dentro del objetivo 3 de la presente tesis.

El área del potencial evocado somestésico registrado en diferentes áreas de la corteza prefrontal se redujo significativamente cuando la corteza S1 fue inhibida mediante la inyección intracortical de lidocaina (0,1–0,3 μ l; 2% en solución salina, n=7 ratas; Figura 28). Para cuantificar esta atenuación se comparó el área del potencial evocado control (100% de la respuesta) con el área del potencial evocado posterior a la inyección intracortical de lidocaína. Como puede apreciarse en la figura 28 la corteza somestésica alcanzó un valor del 25% del potencial evocado control ($p = 0,004$), en la corteza prefrontal la reducción también fue significativa. El potencial evocado respecto del valor control fue en AGm-ACC, 38% ($p = 0,002$), PL, 42% ($p = 0,003$), e IL 36% ($p = 0,002$) respecto de sus valores control. Esta importante atenuación sugiere que la información somestésica que recibe la corteza prefrontal medial surge principalmente a través de una vía polisináptica con origen en S1,

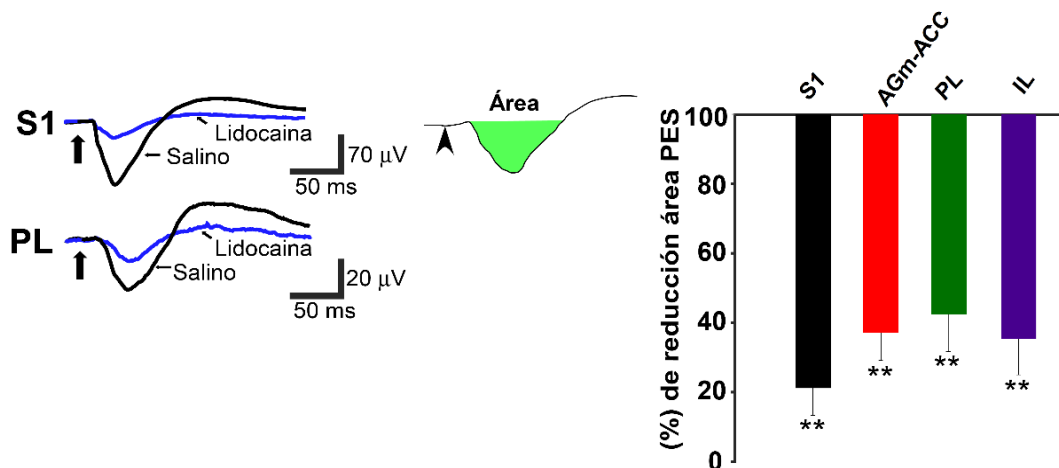


Figura 28. La inyección de lidocaina en corteza S1 reduce el área de los PESs en CPFm y S1, A la izquierda se muestra dos ejemplos de registro en S1 y PL en control y con lidocaina. A la derecha, el gráfico muestra el porcentaje de reducción del área del PEAs en CPFm y S1 por la inyección de lidocaina en S1, Los asteriscos representan la significación estadística, ** = $p < 0,01$, Abreviaturas como en la tabla 1, ver sección abreviaturas

El área de los potenciales evocados auditivos también se redujo significativamente cuando la corteza auditiva esta inhibida mediante inyección intracortical de lidocaína (0,1 – 0,3 μ l; 2% en solución salina; n = 6 ratas; Figura 29). El área del PEA en corteza AGm-ACC fue de un 15% ($p < 0,001$) de su valor control en corteza PL 29% ($p = 0,02$), y en corteza IL 10% ($p = 0,008$).

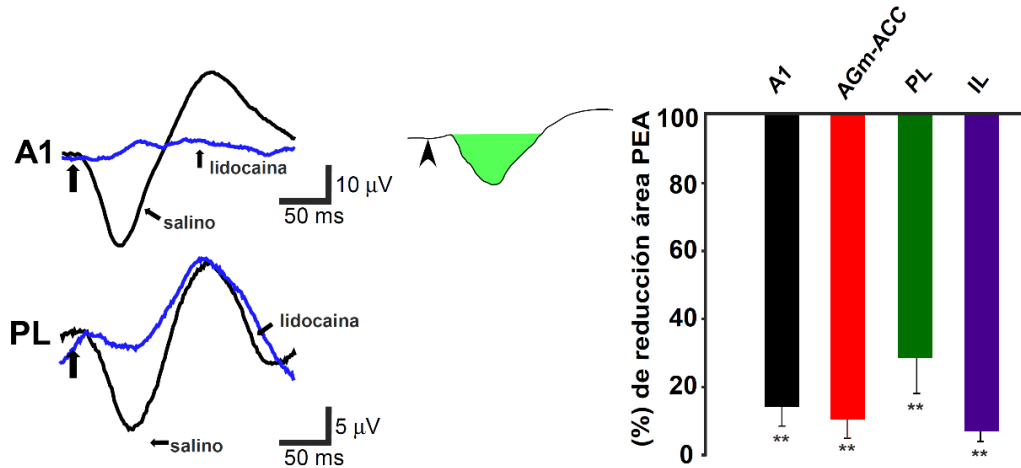


Figura 29. La inyección de lidocaína en corteza A1 reduce el área de los PEAs en CPFm y A1. A la izquierda se muestra dos ejemplos de registro en A1 y PL en control y con lidocaína. A la derecha, el gráfico muestra el porcentaje de reducción del área del PEAs en CPFm y A1 por la inyección de lidocaína en A1. Los asteriscos representan la significación estadística, ** = $p < 0,01$. Abreviaturas como en Tabla 1.

Estos datos sugieren que las aferencias sensoriales auditivas surgen principalmente desde corteza A1.

Es posible que la información sensorial en corteza prefrontal ventral llegue a través de aferencias procedentes de la corteza prefrontal dorsal, ya que los PESs registrados en regiones dorsales (AGm-ACC), tiene una latencia inferior a los PESs registrados en regiones ventrales (PL-IL). Además, los datos anatómicos sugieren que la corteza prefrontal dorsal esta conecta con áreas corticales sensoriales (ver resultados anatómicos). Para verificar esta hipótesis se inactivó la corteza prefrontal dorsal mediante muscimol (agonista selectivo de los receptores GABA_A; 0,1 – 0,3 μ l, 1mM en solución salina) en 10 ratas. Se registraron simultáneamente en corteza AGm-ACC y corteza IL, para reducir la posibilidad de difusión de la droga (Figura 30). El área del PES fue calculada por la aplicación de 60 estímulos en condiciones control (sin droga), y fue comparado con la condición experimental (60 estímulos, 2 o 5 min después de la aplicación de la droga en la región dorsal de la CPFm). El muscimol redujo el

área del PES en la región dorsal de la CPFm a $50,4 \pm 8,1\%$ del valor control, 2 min después de la aplicación de muscimol ($n = 10$, $p = 0,002$), y a $39,5 \pm 8,2\%$ del valor control ($n = 10$, $p < 0,001$), 5min después de la aplicación de muscimol. En estas mismas condiciones, el área del PES en corteza IL, se redujo a $77\% \pm 8,8\%$ del valor control ($n = 10$, $p = 0,002$, 2 min) y a $55,5 \pm 6,2\%$ ($n = 10$, $p < 0,001$, 5min; Figura 30). El hecho que la atenuación sea distinta da cierta información de que no ha habido difusión de la droga a regiones ventrales, es decir, parece que la atenuación en ambas estructuras es diferente, en la región dorsal vendría dada por aumento de la inhibición GABAérgica por el muscimol, y en regiones ventrales por una disminución de las entradas desde regiones dorsales. Estos datos sugieren que la información sensorial que llega a regiones ventrales en parte podría ser debido a aferencias desde regiones dorsales de la corteza prefrontal medial.

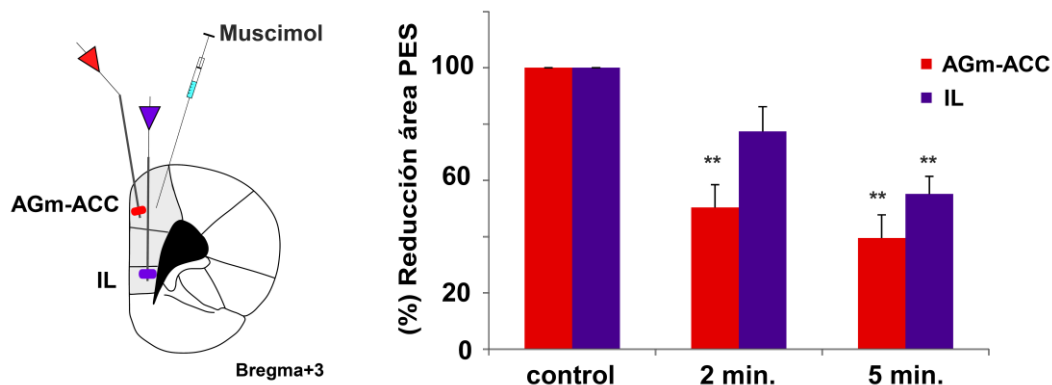


Figura 30, La inyección de Muscimol en AGm-ACC reduce la respuesta en IL. A la izquierda se muestra un esquema anatómico del protocolo de registro. A la izquierda, La inyección de muscimol (0,1–0,3 μ l; 1 mM en solución salina) en la región dorsal de la CPFm reduce el área de los PESs en CPF dorsal y en IL, respecto a los valores control, a 2 min y 5 min después de la inyección. Los asteriscos representan diferencias significativas a los 2 minutos y a los 5 minutos ** = $p < 0,01$,

4.5 Resultados anatómicos.

Estudios anatómicos previos indican que la información sensorial puede llegar a la CPFm a través de vías polisinápticas, para verificar estos hallazgos, y respondiendo al objetivo 3 de la presente tesis, inyectamos Fluorogold (FLGo)

en la región dorsal de la CPFm (n = 5) y en la región ventral de la CPFm (n = 5) para determinar el origen de las aferencias sensoriales.

El trazado con FLGo en corteza AGm-ACC (CPFm dorsal; Figura 31A) reveló la presencia de neuronas marcadas retrógradamente en corteza retrosplenial, corteza motora, corteza somatosensorial, corteza insular, corteza visual secundaria, corteza auditiva, y corteza ectorrinal y perirrinal. También se encontraron neuronas marcadas retrógradamente en corteza PL e IL así como en complejo amigdalino y núcleos de la línea media del tálamo. Es interesante destacar que se observaron neuronas marcadas retrógradamente en la región más caudal del núcleo posterior medial (POm) del tálamo, el cual recibe información sensoria multimodal. Sin embargo, no se encontraron neuronas marcadas retrógradamente en el núcleo ventral postero-medial (VPM) o regiones rostrales del POm los cuales son estaciones de relevo de la vía lemniscal y paralemniscal respectivamente (figura 31A).

Por el contrario, el trazado con FLGo en CPFm ventral (figura 31B, solo reveló algunas neuronas marcadas en corteza motora secundaria, corteza retrosplenial y cortezas ectorrinal. También se encontraron neuronas marcadas retrógradamente en cortezas AGm-AC, lo cual indica la comunicación bidireccional entre la región dorsal de la CPFm y región ventral de la CPFm. Además, se encontraron neuronas marcadas retrógradamente en el complejo amigdalino. No se identificaron neuronas marcadas retrógradamente en núcleo VPM ni núcleo POm (Figura 31B).

Por tanto, estos datos anatómicos sugieren que la corteza AGm-ACC recibe aferencias sensoriales y que puede ser transferida a la región ventral de la CPFm a través de aferencias desde AGM-ACC.

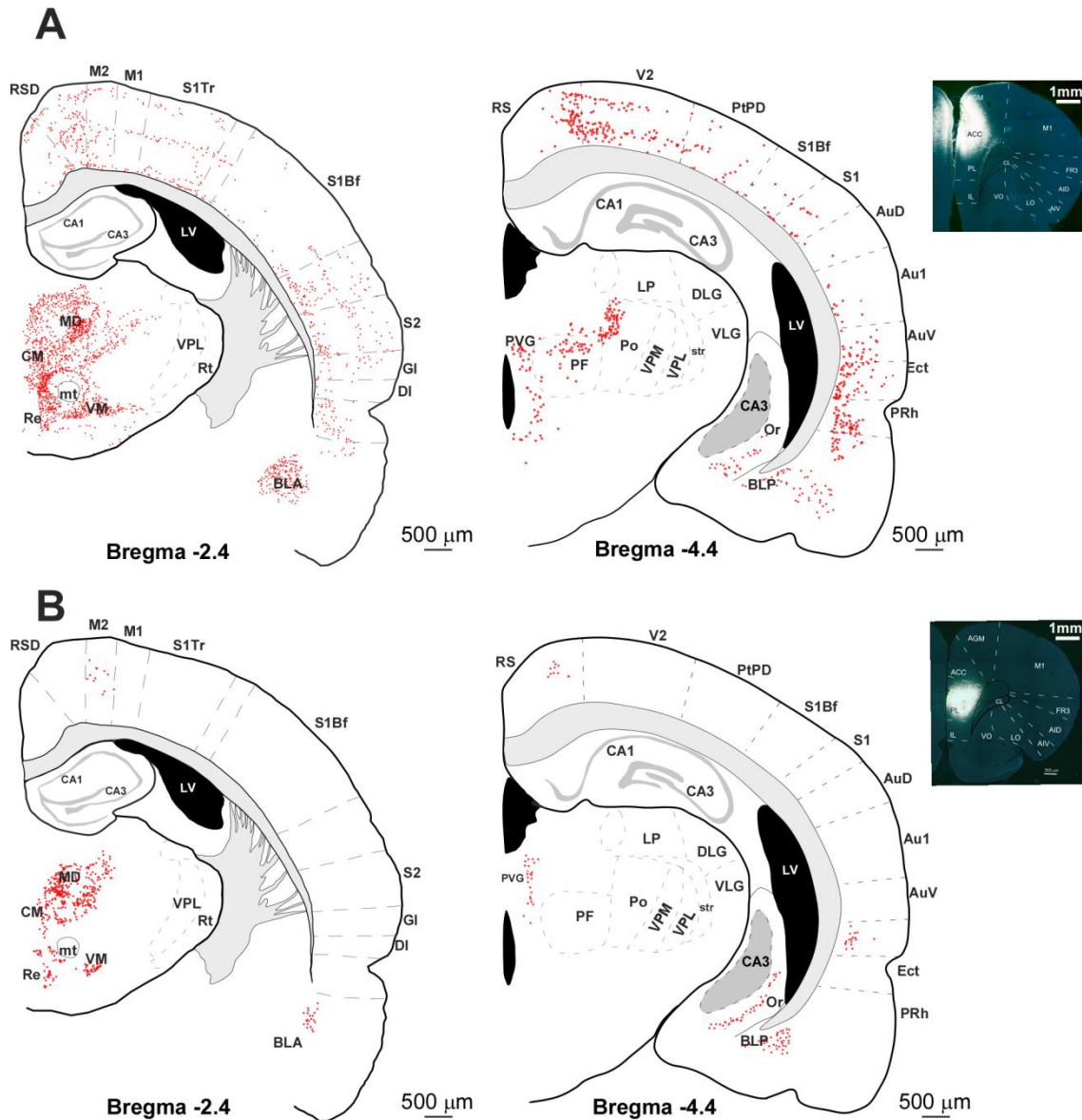


Figura 31, Localización de neuronas que proyectan a CPFm. A. secciones coronales representativas en las que se encontraron neuronas marcadas por inyección de FLGo. En AGm-ACC. La figura insertada muestra el centro de la inyección. Se encontraron neuronas en corteza somestésica y corteza auditiva que proyectan a AGm-ACC. B. Secciones coronales representativas en las que se encontraron neuronas marcadas por inyección de FLGo en PL/IL. Se encontraron neuronas marcadas en corteza motora y retroesplénica. Au1: corteza auditiva primaria, AuD: corteza auditiva secundaria región dorsal, AuV: corteza auditiva secundaria región ventral, BLA: núcleo basolateral anterior de la amígdala, BLP: núcleo basolateral posterior de la amígdala, DI: corteza insular disgranular, CA1: corpus amonis 1, CA3: Corpus amonis 3, CM: núcleo centro-mediano del tálamo, DLG: núcleo geniculado lateral dorsal, Ect: corteza ectorrinal, GI: corteza insular granular, LP: núcleo lateral posterior del tálamo, LV: ventrículo lateral, M1: corteza motora primaria, M2: corteza motora secundaria, MD: núcleo dorso-mediano del tálamo, mt: tracto mamilotalámico, Or: estrato oriens del hipocampo, PF: núcleo parafascicular, Po: núcleo posterior del tálamo, PRh: corteza peririnal, PtPD: corteza parietal posterior, región dorsal, PVG: sustancia gris periventricular, Re: núcleo reuniens del tálamo, RS: corteza retrosplenial dorsal, S1: corteza somestésica primaria, S1Bf: corteza somestésica primaria, región de representación de las vibrisas, S2: corteza somestésica secundaria, str: estriado, VPL: núcleo ventral postero-lateral del tálamo, VPM: núcleo ventral postero-medial del tálamo.

Para responder al objetivo 4 de la presente tesis, diseñamos varios protocolos en los cuales se producen cambios repentinos de frecuencia de estimulación, o se cambia la modalidad de estimulación, o son aplicados simultáneamente.

4.6 La historia de estimulación reciente induce cambios en la corteza prefrontal medial y corteza S1

Para determinar si las neuronas de la CPFm son capaces de detectar cambios en los protocolos de estimulación (secuencia A de estimulación; Figura 32; ver materiales y métodos), seleccionamos unas vibrisas y aplicamos dos trenes de estímulos a 1Hz durante 60 segundos (control), separados 10 segundos (Figura 32A, 1^{er} protocolo). Después en el intervalo de tiempo de 10 segundos entre estos dos trenes de 1Hz, se aplicó un tren de 5Hz (10 segundos) en las mismas vibrisas (Figura 32A, 2^{do} protocolo). Primero, se comparó el área del segundo tren a 1Hz con el primer tren a 1Hz (normalizado al 100% de la respuesta) para calcular el cambio del área del potencial. Posteriormente tras la aplicación de un tren a 5Hz en medio de los dos trenes a 1Hz, nuevamente se comparó el porcentaje de cambio del segundo tren respecto al primer tren (100% de la respuesta). Para el análisis estadístico se compararon las áreas del primer tren y el segundo tren en cada condición experimental (Figura 32A, B). Como puede observarse en la Figura 32B solo la corteza IL detectó la inclusión de un tren de mayor frecuencia (5Hz) en los 10 segundos previos a la aplicación del segundo tren de 1Hz. El área del PES en IL fue de $84,2 \pm 3,7\%$ del valor control (primer tren de 1Hz), $n = 15$, $p = 0,004$. Por el contrario, la corteza AGM-AC ($99,2 \pm 10,3\%$, $n = 15$, $p = 0,789$), la corteza PL ($105,3 \pm 8,7\%$, $n = 15$, $p = 0,833$), y la corteza S1 ($92,9 \pm 3,9\%$, $n = 15$, $p = 0,088$) no detectaron la inclusión del tren de frecuencia en los 10 segundos previos.

También se aplicó un estímulo auditivo para verificar, si este efecto puede ser evocado por la aplicación de un estímulo de distinta modalidad. Más concretamente, se aplicó un tren de pulsos de aire en las vibrisas a 1Hz durante 60 segundos, seguido de un ruido blanco durante 10 segundos, que prosiguió con la aplicación nuevamente de un tren de pulsos de aire a 1Hz

durante 60 en las mismas vibrisas (Figura 32A, 3^{er} protocolo). La aplicación del estímulo auditivo generó una reducción importante del área de la curva del PES en la región ventral de la CPFm, tanto en corteza PL ($79,7 \pm 4,9\%$, $n = 14$, $p = 0,008$) como en corteza IL ($91,6 \pm 2,7\%$, $n = 14$, $p = 0,018$). Sin embargo, la región dorsal de la corteza prefrontal, AGm-ACC ($101 \pm 7,8\%$, $n = 15$, $p = 0,266$) y la corteza S1 ($97,5 \pm 4,9\%$, $n = 24$, $p = 0,121$) no detectaron los cambios. Por tanto, solo la corteza prefrontal ventral, fue capaz de detectar los cambios en la secuencia de estimulación mientras que la región dorsal y corteza S1 no fueron afectadas.

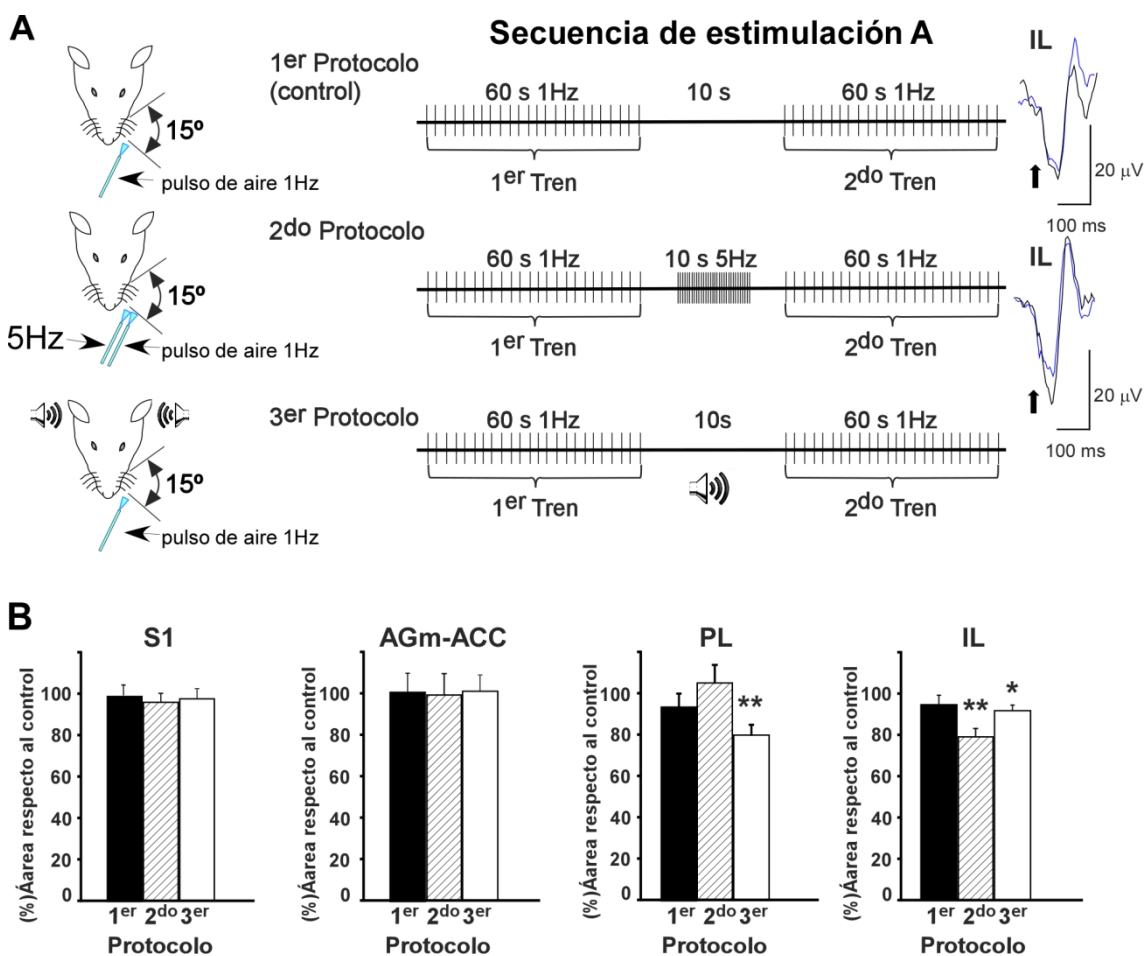


Figura 32. Los cambios en la secuencia de estimulación A inducen cambios en las respuestas táctiles en CPFm. A. Los diagramas muestran las diferentes secuencias de estimulación utilizadas. Entre el primer y el segundo tren de 1Hz, se introduce un tren a 5Hz (2^{do} protocolo) en las mismas vibrisas o un ruido blanco (10-160 kHz, 3^{er} protocolo) estos protocolos fueron comparados con el protocolo control (1^{er} protocolo), los trazos insertados a la derecha, muestran registros representativos en corteza IL del primer protocolo (trazo superior) y del segundo (trazo inferior) el trazo azul representa el primer tren y el trazo negro el segundo tren. La flecha vertical indica el estímulo. B. las gráficas muestran el porcentaje de cambio del segundo tren de 1Hz, respecto del primer tren de 1Hz (100%). AGm-ACC: corteza agranular medial + corteza cingular anterior, IL: corteza infralímbica, PL, corteza prelímbica, S1 corteza somestésica primaria. Los asteriscos indican la diferencia estadística respecto al primer periodo de 1Hz (control), ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$.

También se calculó el porcentaje de cambio en el protocolo control, esto es 2 trenes de estimulación a 1Hz durante 60 segundos, entre los cuales no se aplica ninguna estimulación (Figura 32A, 1er protocolo). En estas condiciones la respuesta media en el primer periodo y en el segundo periodo fue similar, sin diferencias estadísticamente significativas en ninguna región. Estos resultados fueron observados en corteza AGm-ACC ($99.4 \pm 5.9\%$, $n = 14$, $p = 0,51$), en corteza PL ($114.5 \pm 12.8\%$, $n = 9$, $p = 0,318$), en corteza IL ($94.3 \% \pm 4.6\%$, $n = 10$, $p = 0,498$), así como en corteza S1 ($101,5 \pm 3.6\%$, $n = 12$, $p = 0,469$, Figura 32B).

Para estudiar más a fondo estos cambios, se cambió la secuencia de estimulación (Figura 33), en este caso, se aplicaron 2 trenes de 5Hz a unas vibrisas seleccionadas separados entre ellos 60 segundos sin estimulación (durante este periodo (protocolo control, Figura 33A, 1^{er} protocolo), o se aplicó una estimulación sensorial, tren a 1Hz en las mismas vibrisas (Figura 33A 2^{do} protocolo) o un ruido blanco (Figura 33A, 3^{er} protocolo). Nótese que la frecuencia de 5Hz es una frecuencia similar a la utilizada por las ratas para explorar objetos con las vibrisas (Carvell y Simons, 1990; Melzer et al., 2006).

En estas condiciones el PES del primer tren (5Hz) de estimulación de las vibrisas fue usado como periodo control. Cuando no se aplicó ningún estímulo entre los dos periodos de estimulación de 5Hz (Figura 33A, 1er protocolo), no hubo diferencias significativas entre el PES del primer tren y el segundo tren; estos resultados fueron observados en corteza AGm-AC ($105,3 \pm 6.3\%$, $n = 14$, $p = 0,51$), en corteza PL ($96.5 \pm 8,4\%$, $n = 9$, $p = 0,318$), en corteza IL ($108,9 \pm 5.1\%$ $n = 9$, $p = 0,498$) y en corteza S1 ($101,5 \pm 3.6\%$, $n = 12$, $p = 0,469$; Figura 33 A, B).

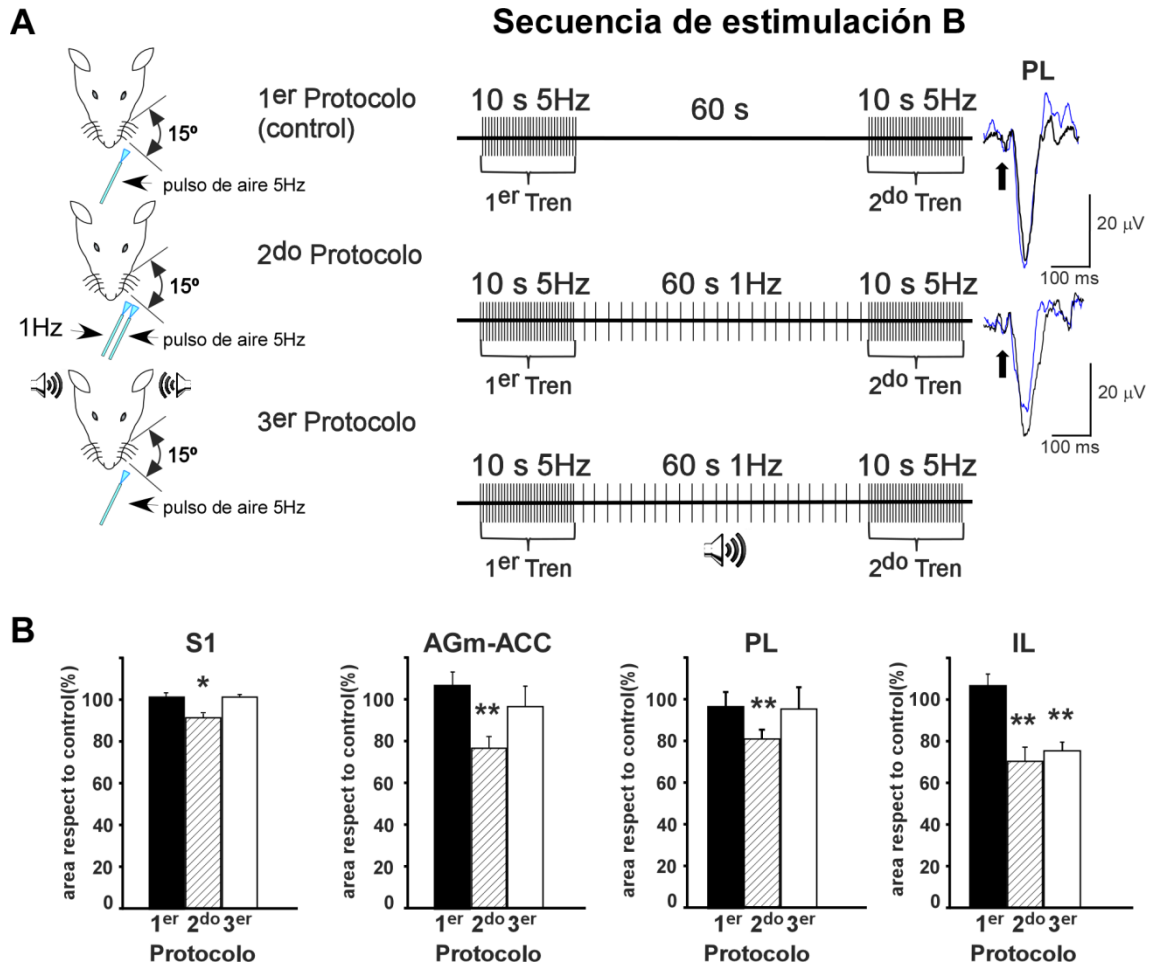


Figura 33. Los cambios en la secuencia de estimulación B, induce cambios en las respuestas táctiles de la CPFm. A. los diagramas muestran los protocolos de estimulación utilizados. El 1^{er} protocolo consistió en 2 trenes de 5Hz en las vibrisas, con un intervalo entre ellos de 60 segundos. En el segundo protocolo se introdujo un tren (1Hz) en las mismas vibrisas, entre los dos trenes de 5Hz. En el tercer protocolo, se introdujo un tren de clics (1Hz, 1ms, 60 segundos) entre los dos trenes de 5Hz. Los trazos insertados a la derecha muestran un PES representativo registrado en PL del 1^{er} protocolo (trazo superior) y del 2^{do} protocolo (trazo inferior), la línea negra representa el PES del primer tren, y la línea azul el PES del segundo tren. La flecha vertical indica el estímulo. B. La gráfica muestra el porcentaje de cambio de los PES respecto al control (1^{er} tren) en diferentes áreas de la CPFm y S1, Todas las cortezas mostraron PES mayores en el primer tren. Los cambios fueron mayores en la CPFm que en corteza S1, Solo la corteza IL, se vio afectada por la presentación de un estímulo auditivo. AGm-ACC: corteza agranular medial + corteza cingular anterior, IL: corteza infralímbica, PL, corteza prelímbica, S1 corteza somestésica primaria. Los asteriscos indican la diferencia estadística con respecto al primer periodo de 5Hz (control), * = $p < 0,01$,

Cuando se aplicó una estimulación sensorial en las mismas vibrisas (tren 1Hz, 20 ms, 60 s) durante el intervalo de tiempo de 60 segundos entre los dos trenes de 5Hz (Figura 33A segundo protocolo), todas las áreas corticales redujeron su respuesta en el segundo tren de 5Hz cuando se comparó con el primer tren de estimulación de 5 Hz, (AGm-ACC, $77.7 \pm 5.2\%$, $n = 9$, $p = 0.004$; PL, $81.3 \pm 4.6\%$, $n = 12$, $p = 0.003$; IL, $70 \pm 8.5\%$, $n = 12$, $p = 0.001$; S1, $92.2 \pm 3.3\%$, $n = 20$, $p = 0.01$; Figura 33B). Sin embargo, si aplicamos un tren auditivo (clic, 1ms, 1Hz, 60seg) entre los dos trenes solo la corteza IL detectó el cambio en la modalidad de estimulación ($75.2 \pm 5.7\%$, $n = 14$, $p = 0.001$); por el contrario, el resto de áreas no modificaron significativamente su respuesta (AGm-ACC, 96.7 ± 10.1 , $n = 15$, $p = 0.707$; PL, $95.1 \pm 13\%$, $n = 14$; $p = 0.301$; S1, $101 \pm 3\%$, $n = 25$, $p = 0.342$; Figura 33B). Teniendo en cuenta todo lo anterior, los resultados sugieren que existe integración sensorial de diferentes modalidades y que el cambio en la historia previa de estimulación reciente provoca cambios en la respuesta en la corteza CPFm, principalmente en la corteza IL, Por el contrario, en la corteza S1 no se ve afectada su respuesta por la inclusión un estímulo de diferente modalidad sensorial.

No obstante, la reducción del área del PES observado en los protocolos anteriores puede ser debido a la adaptación neuronal. Para verificar esta hipótesis sobre el curso temporal de la respuesta, y responder al objetivo 5 de la presente tesis, se dividió el tren de 60 estímulos del protocolo de la secuencia A en 3 periodos de 20 estímulos cada uno, y se calculó el área de la curva del PES tomando como periodo control el primer periodo (100% de la respuesta). Por tanto, los tres primeros periodos de 20 estímulos surgen del primer tren de estimulación (control, 1Hz, 60 s), y los segundos 3 periodos de 20 estímulos surgen del segundo tren de estimulación (1Hz, 60 s; Figura 34). Para este análisis se eligieron los PES de la corteza IL, ya que esta área fue la que mostro mayores cambios en el área del PES. La aplicación de un tren a 1Hz, 60 segundos, seguido por un segundo tren a 1Hz muestra una reducción progresiva de la respuesta, siendo esta reducción en el tercer periodo del primer tren del $68 \pm 6.2\%$ de la respuesta del valor control del primer periodo ($n = 15$, $p = 0.003$; Figura 34A). La respuesta se recuperó a valores control en el primer periodo del segundo tren después de 10 segundos sin estimulación

entre ellos ($106.5 \pm 10.1\%$, $n = 15$, $p = 0.89$; Figura 34A). Sin embargo, no se observó esta recuperación cuando se aplicó un estímulo sensorial entre los dos trenes. La respuesta se mantuvo a $73.5 \pm 4.4\%$ ($n = 15$, $p = 0.001$) del valor control cuando se aplicó un tren de 5Hz (mismas vibrisas) entre los dos trenes de 1Hz, y 75.9 ± 5.8 ($n = 15$, $p = 0.003$ cuando se aplicó un ruido blanco entre los dos trenes (Figura 34A).

También se estudió el curso temporal del área del PES en los trenes de 5Hz del protocolo de la secuencia B; para ello se dividió el primer tren y el segundo tren en 3 periodos de 16 estímulos (Figura 34). Cuando se aplican dos trenes de 5Hz sin estimulación en el intervalo de 60 segundos entre ellos, el área del PES en el primer tren, se redujo en el tercer periodo hasta un $59.9 \pm 5.7\%$ de la respuesta control del primer periodo ($n = 15$, $p = 0.001$). En el segundo tren la respuesta en el primer periodo se recuperó ($100.3 \pm 9.4\%$, $n = 15$, $p = 0.738$) respecto del valor control (primer periodo del primer tren). Sin embargo, la respuesta no se recuperó al valor control cuando se aplicó un tren a 1Hz ($71 \pm 7.5\%$, $n = 15$, $p = 0.009$) o un clic auditivo a 1Hz ($69 \pm 6.3\%$, $n = 15$, $p = 0.001$; Figura 34B). En resumen, la historia previa de estimulación afecta a la adaptación de la respuesta a la estimulación de las vibrisas de las neuronas de corteza IL, y bloquea la recuperación de la respuesta. Sin embargo, si existe recuperación de la respuesta cuando no hay una estimulación previa a la aplicación del tren en las vibrisas.

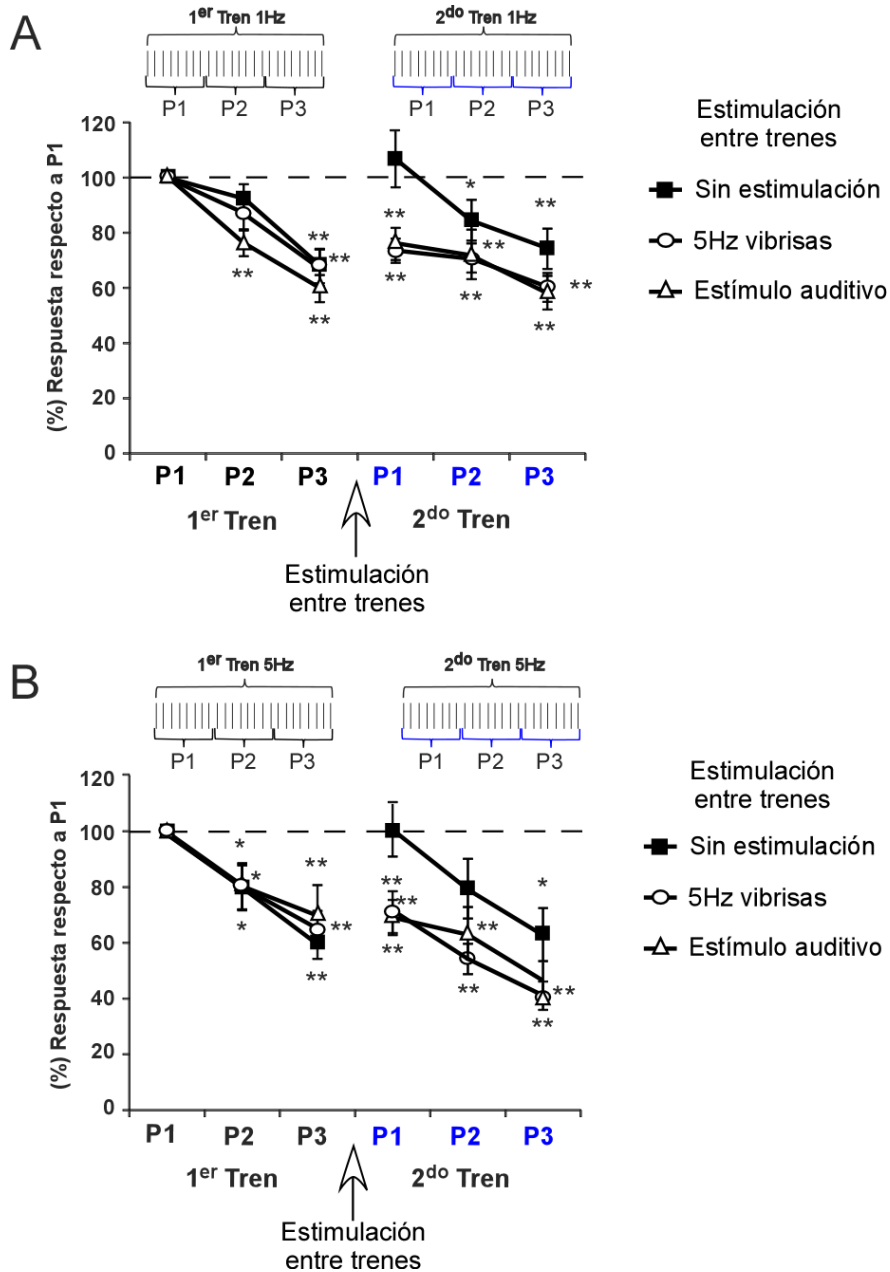


Figura 34. Curso temporal de los PES en corteza IL, durante los cambios de secuencia A y B. A. El gráfico muestra el área de los PESs en periodos de 20 estímulos (1Hz) a lo largo del experimento. Se utilizó como periodo control el primero de los tres periodos. Los primeros tres periodos surgen del primer tren de 1Hz y los segundos tres periodos surgen del 2^{do} tren de estimulación de 1Hz. Los cuadrados negros muestran la evolución temporal del PES a lo largo del 1^{er} protocolo (sin estimulación entre trenes). Los círculos blancos muestran la evolución temporal del PES cuando se introduce un tren a 5 Hz entre los dos trenes. Los triángulos blancos muestran la evolución temporal del PES cuando se introduce un ruido blanco entre los dos trenes. La flecha vertical indica el momento en el que se introduce el tren de cambio de secuencia (5Hz o ruido blanco). La recuperación de la respuesta del primer periodo del segundo tren, ocurre cuando no hay estimulación sensorial entre los dos trenes de 1Hz. B. se muestra la evolución temporal de los PES, en los protocolos de la secuencia B (figura 30 A). el efecto fue similar al ocurrido en A, la recuperación de la respuesta del primer periodo del segundo tren ocurre cuando no hay estimulación sensorial entre los dos trenes de 5Hz. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de primer periodo del primer tren. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$,

4.7 La interferencia sensorial provoca cambios en la respuesta en la corteza prefrontal medial.

Hasta ahora los resultados mostrados demuestran que la CPFm recibe información sensorial, de diversas áreas corticales, y que estas respuestas fueron modificadas por la secuencia previa de estimulación. Para estudiar las interacciones en la CPFm cuando aparecen dos estímulos simultáneamente, (lo que hemos denominado interferencia sensorial) y continuando con el objetivo 4 de la presente Tesis, se estimularon las vibrisas, mientras se estimulan las vibrisas contralaterales con un pincel durante 60 segundos (interferencia somatosensorial; Figura 35A), o cuando se aplicó un ruido blanco durante 60 segundos (interferencia auditiva; Figura 35C). Para ello se calculó el área de los PES registrados en CPFm durante el siguiente protocolo de estimulación: se aplicó un primer tren de 60 pulsos de aire en las vibrisas (1Hz, 60 segundos; control, 100% de la respuesta), a continuación, se aplicó un segundo tren idéntico al anterior durante el cual se aparece la interferencia sensorial, y finalmente se aplica un tercer tren en las vibrisas idéntico al primero (Figura 35A, C).

La aplicación simultanea de otra estimulación somatosensorial en las vibrisas contralaterales, redujo el área de la respuesta en la corteza IL ($77,6 \pm 6,4\%$, $n = 19$; $p = 0,005$) y en corteza AGm-ACC ($87,8 \pm 8\%$, $n = 18$, $p = 0,035$), pero no modifico la respuesta significativamente en corteza PL ($94,5 \pm 5,3\%$, $n = 17$, $p = 0,235$) o en corteza S1 ($94,9 \pm 3,1\%$, $n = 15$, $p = 0,256$; Figura 35B). Las latencias no se vieron modificadas por estos protocolos.

Cuando se utilizó un ruido blanco como interferencia sensorial se observó una reducción significativa en corteza IL ($81,7 \pm 4,6\%$, $n = 12$, $p = 0,008$). Sin embargo, en la corteza AGm-ACC ($97 \pm 7,4\%$, $n = 15$, $p = 0,611$), en la corteza PL ($97,7 \pm 5,2\%$, $n = 17$, $p = 0,471$), y en la corteza S1 ($95,6 \pm 2,3\%$, $n = 27$, $p = 0,075$; Figura 35D) no se observaron cambios estadísticamente significativos, por la presencia de una interferencia sensorial durante la estimulación de las vibrisas.

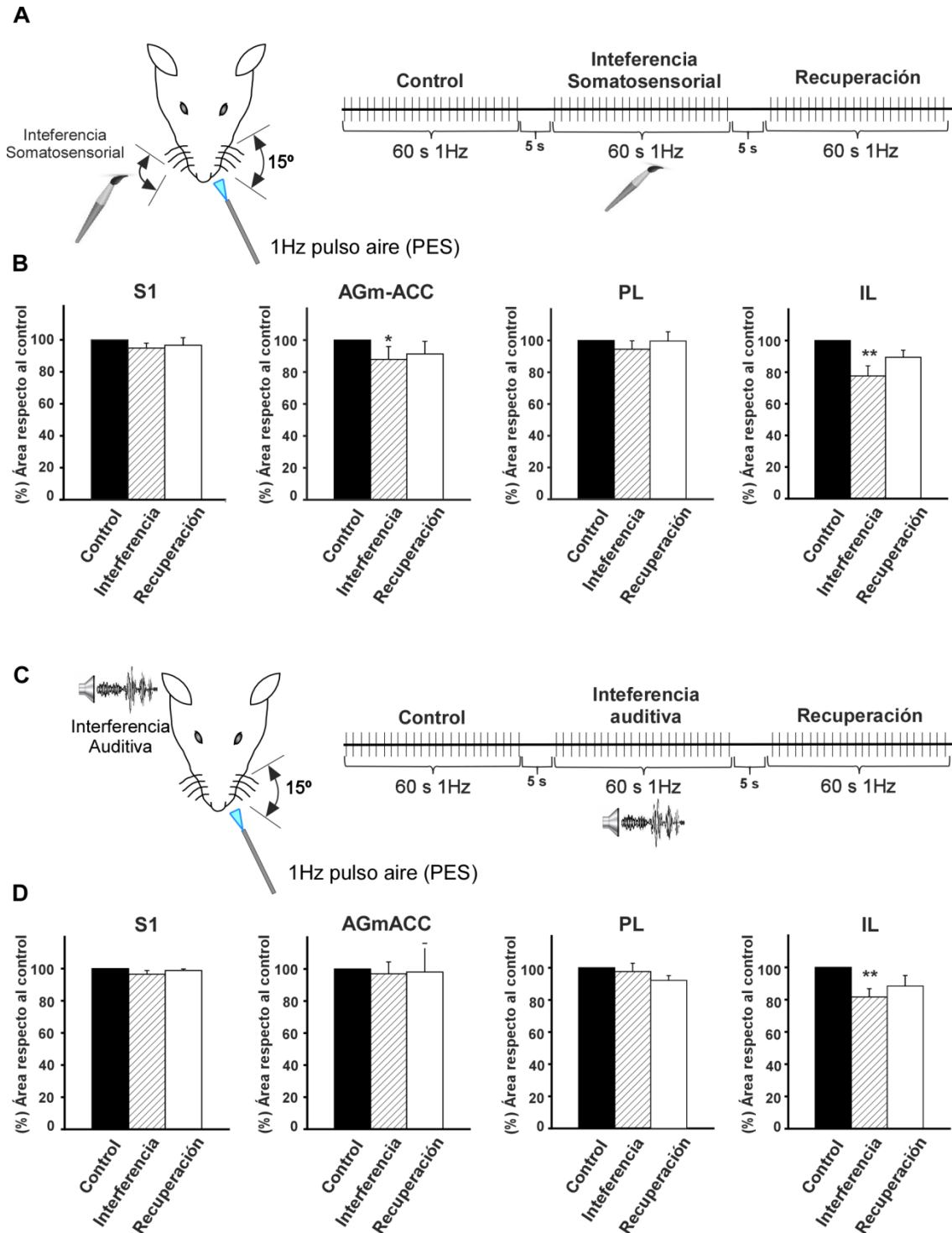


Figura 35. La interferencia sensorial induce cambios en las respuestas táctiles en CPFm. A. la interferencia somatosensorial fue generada por estimulación continua de las vibrisas contralaterales con un pincel durante el primer tren de 1 Hz. El primer tren fue utilizado como periodo control (100%). A la izquierda se muestra una imagen explicativa del proceso de estimulación. B. En el gráfico se observa una importante reducción del área del PES en corteza AGm-ACC y corteza IL. C. en este caso la interferencia auditiva fue generada por aplicación simultánea en el segundo tren de un ruido blanco (10-160 kHz, 60 segundos) durante el segundo tren de 1Hz. A la izquierda se muestra una representación explicativa del proceso de estimulación D. En la gráfica se observa una importante reducción del área en corteza IL cuando se aplica la interferencia auditiva. AGm-ACC: corteza agranular medial+corteza cingular anterior, IL: corteza infralímbica, PES: potencial evocado auditivo, PL: corteza prelímbica, S1: corteza somestésica primaria.

Para identificar si esta interferencia sensorial también ocurre a nivel auditivo, se calculó el área de los PEAs generados por un clic (1Hz, 60 segundos en cada tren) registrados en CPFm (Figura 36A), y se utilizó la estimulación de las vibrisas contralaterales con un pincel como interferencia somatosensorial. La aplicación simultanea de un estímulo somatosensorial redujo el área de los PEAs en corteza PL ($57,7 \pm 10,1\%$, $n = 10$, $p = 0,034$), en corteza PL ($42,2 \pm 8,2\%$, $n = 9$, $p < 0,001$) y en corteza auditiva ($80 \pm 3.2\%$, $n = 15$, $p = 0,007$) pero no en la corteza AGm-ACC ($87,6 \pm 12,2\%$, $n = 8$, $p = 0,664$; Figura 36B) las latencias de los PEAs no se vieron modificadas por este protocolo.

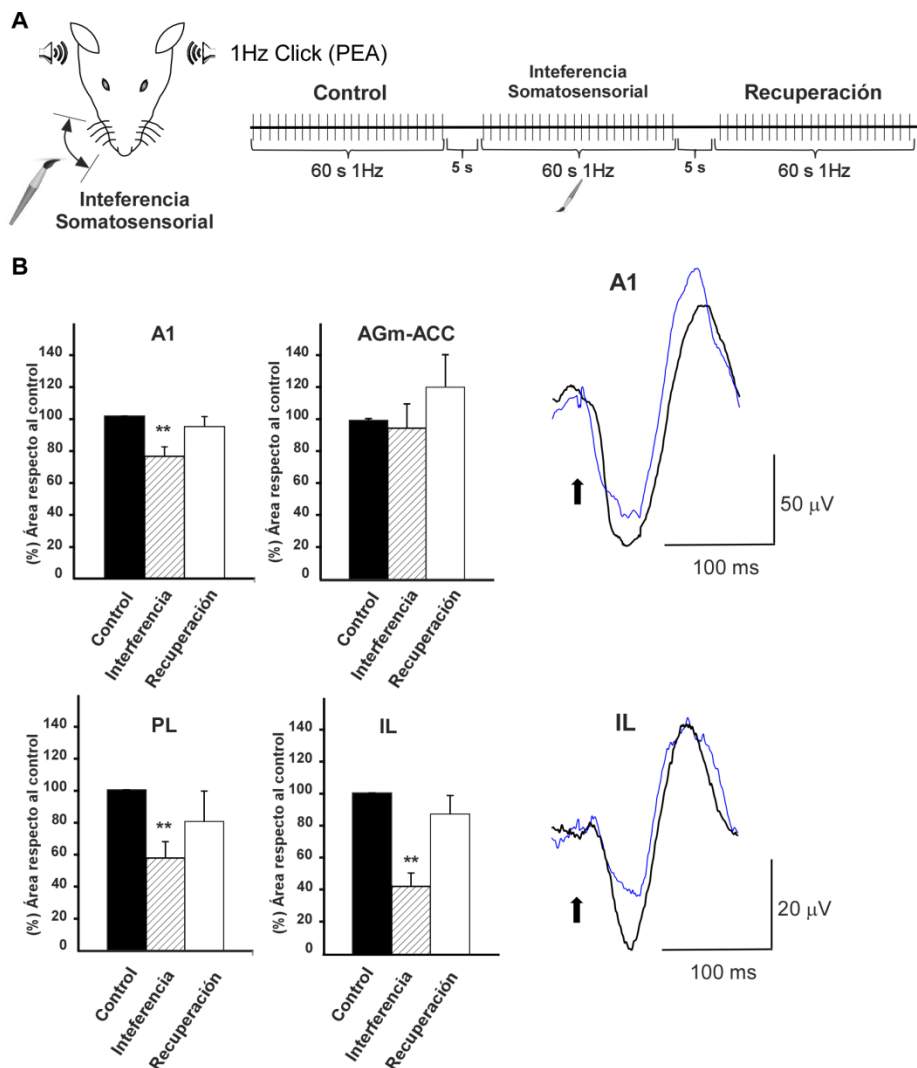


Figura 36. La interferencia sensorial induce cambios en las respuestas auditivas en la CPFm. A. El diagrama muestra el protocolo utilizado, para la generación de la interferencia somatosensorial se estimularon las vibrisas contralaterales durante el segundo tren clics de 1 Hz. B. El gráfico se muestra el porcentaje de reducción de las áreas de los PEAs. Se observa una importante reducción del PEA en corteza PL, corteza IL y corteza A1, A la derecha se muestra un ejemplo de PEA en corteza A1 (trazo superior) y corteza IL (trazo inferior). Los asteriscos indican el nivel de significación, $** = p < 0,01$, abreviaturas igual que en Figura 35.

4.8 La ω -Agatoxina modifica las respuestas de la corteza Prefrontal medial.

Los resultados mostrados anteriormente enmarcados dentro del objetivo 4 y 5 de la presente Tesis indican que las neuronas de la corteza prefrontal medial reducen la respuesta de las vibrisas en función de la secuencia previa de estimulación y en función de las interferencias estimulares. Para verificar si las interneuronas parvalbumina positivas (PV) son responsables de esta reducción de la respuesta, ya que estas neuronas controlan la excitabilidad neuronal (Castejón et al., 2016), usamos ω -agatoxina porque es conocido que los canales de Ca^{2+} voltage dependientes Cav 2.1 (tipo P/Q) se expresan en los terminales axónicos de las interneuronas PV de disparo rápido y median la liberación perisomática de GABA hacia las neuronas piramidales (Toledo-Rodriguez et al., 2004; Hefft and Jonas, 2005; Zaitsev et al., 2007). Por consiguiente, la aplicación de ω -agatoxina (0,1 μl in solución salina, 100nM) en la region ventral de la corteza prefrontal medial (PL/IL), generó un aumento del área del PES ($133,4 \pm 13,9\%$, $n = 7$, $p = 0,04$, Figura 37B), 5 minutos después de la aplicación de la droga, sin embargo, no modificó la latencia de las respuestas ($51,9 \pm 2.3$ ms en condiciones control, a 53 ± 2.2 ms, $p = 0,759$, medidas 5 minutos después de la aplicación de la droga)

Se calculó el área del PES registrado en corteza IL, y se aplicó, el protocolo de interferencia somatosensorial utilizado anteriormente (tres trenes 1Hz, 60 segundos cada uno, durante el segundo tren se estimulan con un pincel las vibrisas contralaterales durante 60 segundos, y se compararon con el primer tren considerado control, 100% de la respuesta), con el objetivo de estudiar la participación de las interneuronas PV en la interferencia sensorial. Para ello se repitieron los experimentos de interferencia somatosensorial sin ω -Agatoxina, registrandose nuevamente una importante reducción del área del PES ($76,6 \pm 2,9\%$, $n = 7$, $p = 0,001$; Figura 37B, salino). Sin embargo, cuando se inyectó ω -Agatoxina en PL/IL (100nM, 0,1 μl en solución salina) no se detectó reducción de la respuesta durante el tren en el cual aparece la interferencia somatosensorial ($101,9 \pm 7.6\%$, $n = 7$, $p = 0,484$; Figura 37B, ω -Agatoxina).

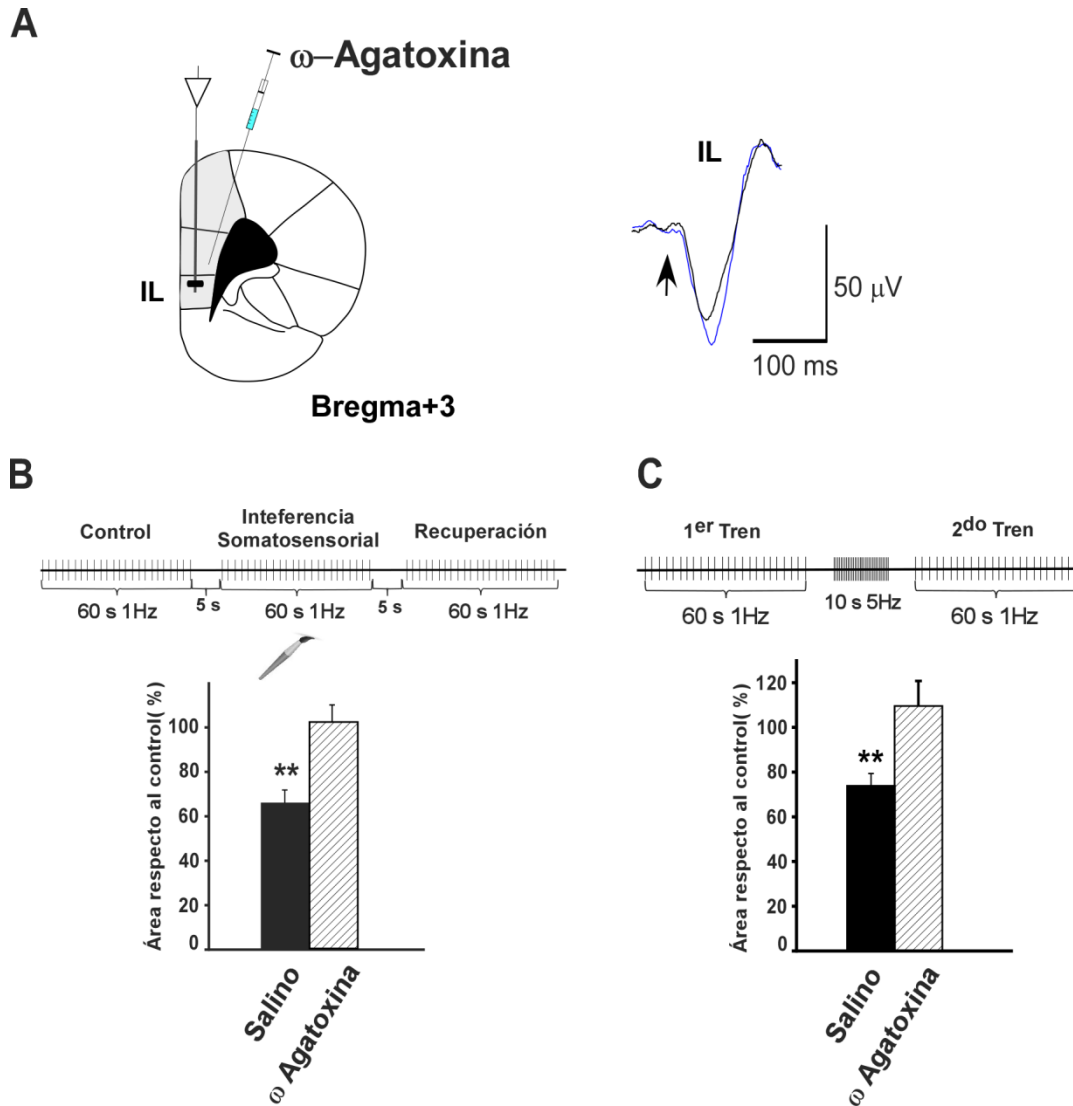


Figura 37. Los efectos inducidos por la secuencia A de estimulación o la interferencia somatosensorial son bloqueadas por aplicación de ω -Agatoxina. A. Se muestra una representación esquemática anatómica del diseño experimental. A la derecha se muestra un ejemplo de registro PES control antes (línea negra) y después (línea azul) de la aplicación de ω -Agatoxina (0,1 μ l in solución salina, 100nM), se usó esta toxina para bloquear selectivamente los canales cav 2.1 (tipo P/Q) de calcio voltaje dependientes, que se expresan en interneuronas PV. B. la interferencia somatosensorial (diagrama superior) fue bloqueada por aplicación de ω -Agatoxina en PL/IL (gráfico inferior) en comparación con el control (salino). C. la reducción del área del PES generada por la aplicación de la secuencia A (2^{do} Protocolo, diagrama superior) fue bloqueada por aplicación de ω -Agatoxina en PL/IL (gráfica inferior). En ambos experimentos el primer tren de 1Hz fue utilizado como control (100%). Los asteriscos indican la diferencia significativa, ** = $p < 0,01$, IL: corteza infralímbica.

También se verificó si la reducción del área del PES observada en corteza IL cuando se cambió la secuencia previa de estimulación fue afectada por la inyección de ω -agatoxina (0,1 μ l, 100nM en solución salina) en corteza PL/IL. En control (sin agatoxina) se observó una reducción del área del PES en el segundo tren ($73,9 \pm 5.5\%$, $n = 7$, $p = 0,003$) en comparación con el primer tren

(100% de la respuesta), este efecto fue bloqueado por la inyección de agatoxina en PL/IL ($109 \pm 11,2\%$, $n = 7$, $p = 0,306$; Figura 37C).

4.9 La aplicación de eserina induce cambios en las respuestas sensoriales.

Como se comentó anteriormente, los niveles de ACh en la corteza cambian acorde al ciclo vigilia-sueño o al nivel atencional (Jasper y Tesser, 1971) y la relación corteza prefrontal, prosencéfalo basal están íntimamente relacionadas funcionalmente. Los siguientes experimentos están enmarcados dentro del objetivo 6 de la presente Tesis.

Para determinar la localización de mayor actividad colinérgica en la corteza prefrontal, se realizó la técnica de reacción enzimática para la acetilcolinesterasa ($n= 6$ ratas), enzima que está presente en los terminales colinérgicos (Figura 38).

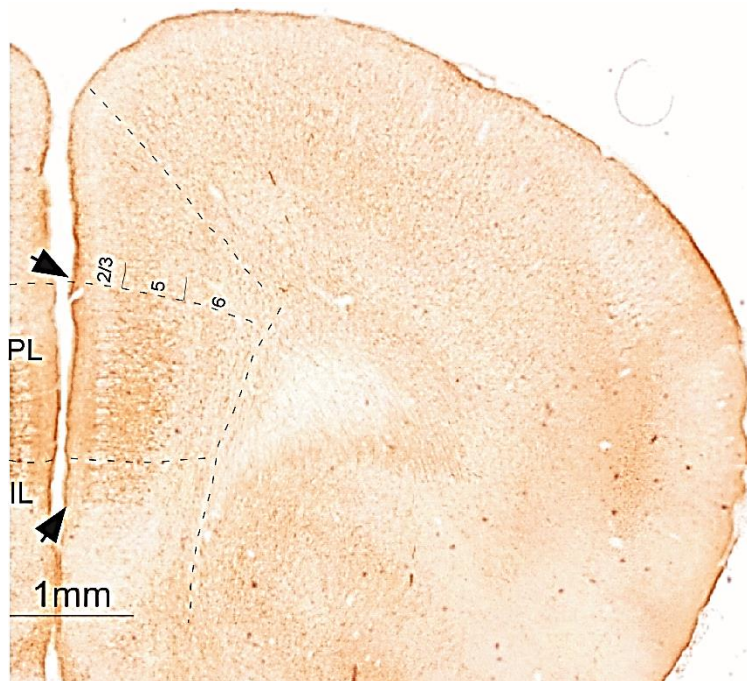


Figura 38. Tinción histoquímica debida a la reacción enzimática de la acetilcolinesterasa en una sección coronal representativa de la CPFm. La corteza PLy la región dorsal de la corteza IL muestra una tinción más intensa que el resto de áreas de la CPFm, siendo especialmente intenso en capa 1, capa 2 y capa 5.

Como puede observarse, existe un parche intenso de reacción a la acetilcolinesterasa en la zona ventral de la CPFm, que corresponde a la región de corteza PL y una pequeña porción dorsal de IL. En la corteza PL y en la región más dorsal de la corteza IL se aprecia una reacción especialmente intensa en capas 1, 2/3 y 5, siendo menor en capa 6. Esto sugiere que existe una mayor actividad colinérgica en la corteza PL y en IL dorsal.

Por tanto, para determinar si unos mayores niveles de ACh modifican las respuestas táctiles en CPFm y los procesos de plasticidad que hemos observado anteriormente, se inyectó eserina (1mg/1kg) intraperitoneal (Inhibidor reversible de la Acetilcolinesterasa), simulando un estado de mayor actividad colinérgica generaliza en todo el sistema nervioso. Se estimularon las vibrisas mediante un pulso de aire (20 ms) para obtener los potenciales evocados; se calculó el área del potencial registrado en corteza PL, IL y S1, 15 minutos después de la inyección i.p. de eserina.

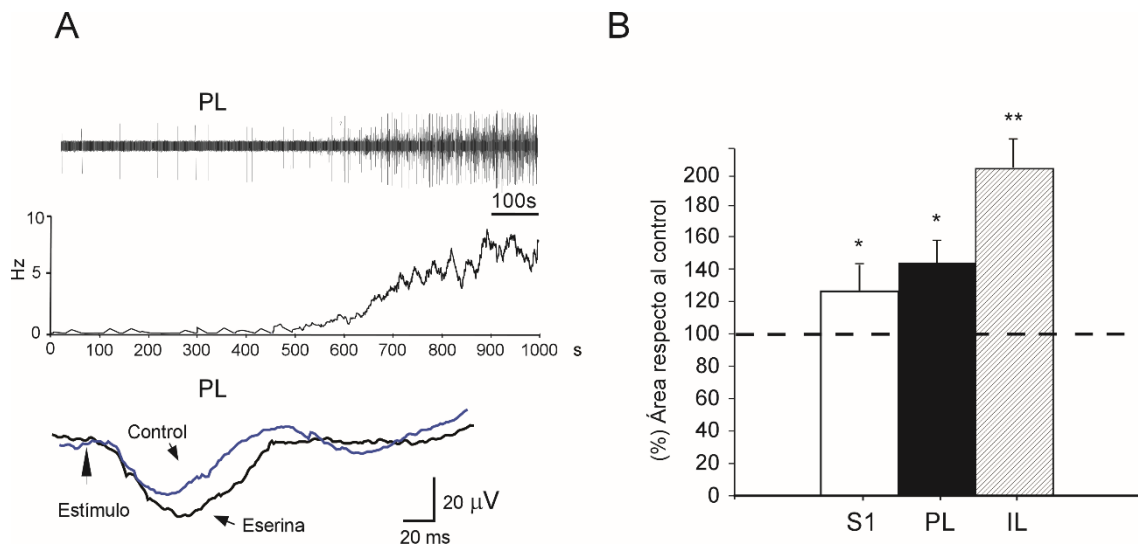


Figura 39. La aplicación de eserina, aumenta el área del PES en corteza prefrontal. A. En la imagen superior izquierda se muestra la evolución temporal de la frecuencia media (Bin = 20 seg) de disparo en un registro multiunitario. En la imagen inferior izquierda se muestra un ejemplo de PES registrado en corteza PL. A la derecha se cuantifica el porcentaje de cambio del área del PES en corteza S1, corteza PL y corteza IL respecto al control (antes de la inyección) la línea discontinua representa el valor control. IL: corteza infralímbica, PL: corteza prelímbica, S1 corteza somestésica primaria.

La aplicación de eserina generó a los 15 minutos un aumento de la frecuencia media espontánea (<1 Hz antes de la eserina a >5 Hz 10 minutos después de la inyección i.p. de eserina; Figura 39A). El área del PES aumentó

significativamente en corteza S1 ($127.87 \pm 13.08\%$, $n = 8$ ratas, $p < 0,05$), en corteza PL ($141,09 \pm 13,83\%$, $n = 8$ ratas, $p < 0,05$), y en corteza IL ($206,40 \pm 17,29\%$, $n = 8$, $p < 0,01$; Figura 39B). La latencia al pico no cambio significativamente en la corteza S1 ($40 \pm 1,7\text{ms}$, control, 44 ± 4 ms con eserina, $n = 8$ ratas, $p = 0,11$), sin embargo, si fue significativamente mayor en PL ($41,6 \pm 1,6$ ms en control, 50 ± 2.9 ms con eserina, $n = 8$ ratas, $p < 0,05$) y en IL ($44 \pm 1,26$ ms en control, $54,2 \pm 1,89$ ms con eserina, $n = 8$ ratas, $p < 0,01$).

4.10 La estimulación eléctrica y optogenética de la banda diagonal de broca induce cambios en corteza prefrontal medial.

Continuando con el objetivo 6 de la presente Tesis, se estimuló el área HDB del prosencéfalo basal porque es una de las áreas colinérgicas que proyecta a la CPFm. Se usaron métodos optogenéticos para la estimulación directa de neuronas de HDB transfectadas por vector viral basado en virus adeno-asociado (AAV5-CaMKII α ::ChR2(H134R)-eYFP.WPRE.hGH, Addgene26969P, Penn Vector Core, University North Carolina; Figura 40A). Se registraron PES en la corteza S1 y en la CPFm, concretamente en la corteza PL por estimulación de las vibrisas. Se calculó el área promedio de la primera onda negativa del PES cada 60 estímulos, y se comparó respecto al primer periodo control (100%). La estimulación optogenética, indujo un incremento del PES en la corteza S1 (Figura 40B). El área del PES aumento rápidamente alcanzando el valor máximo a los 2 minutos después de la estimulación con luz azul en HDB ($172 \pm 25\%$, $n = 8$ ratas, $p = 0,018$). Este aumento se mantuvo hasta 4 minutos después de la estimulación ($155 \pm 27\%$, $n = 8$ ratas, $p = 0,042$). Por el contrario, en la CPFm fue inhibida por la estimulación con luz azul en HDB, el área del PES disminuyó lentamente alcanzando la significación estadística 3 minutos después de la estimulación en HDB ($78 \pm 8\%$, $p = 0,004$ a los 3 minutos y $83 \pm 9\%$, $p < 0,001$, a los 4 minutos $n = 10$ ratas).

Estos efectos en el área del PES fueron principalmente colinérgicos ya que la facilitación encontrada en la corteza S1 fue bloqueada por la aplicación i.p de atropina (5 mg/kg; $84 \pm 5\%$, $n = 6$ ratas, $p < 0,001$, comparado con los valores

control $155 \pm 27\%$; Figura 40C). Lo cual sugiere que el efecto facilitador encontrado en corteza S1 es mediado principalmente por activación de receptores muscarínicos.

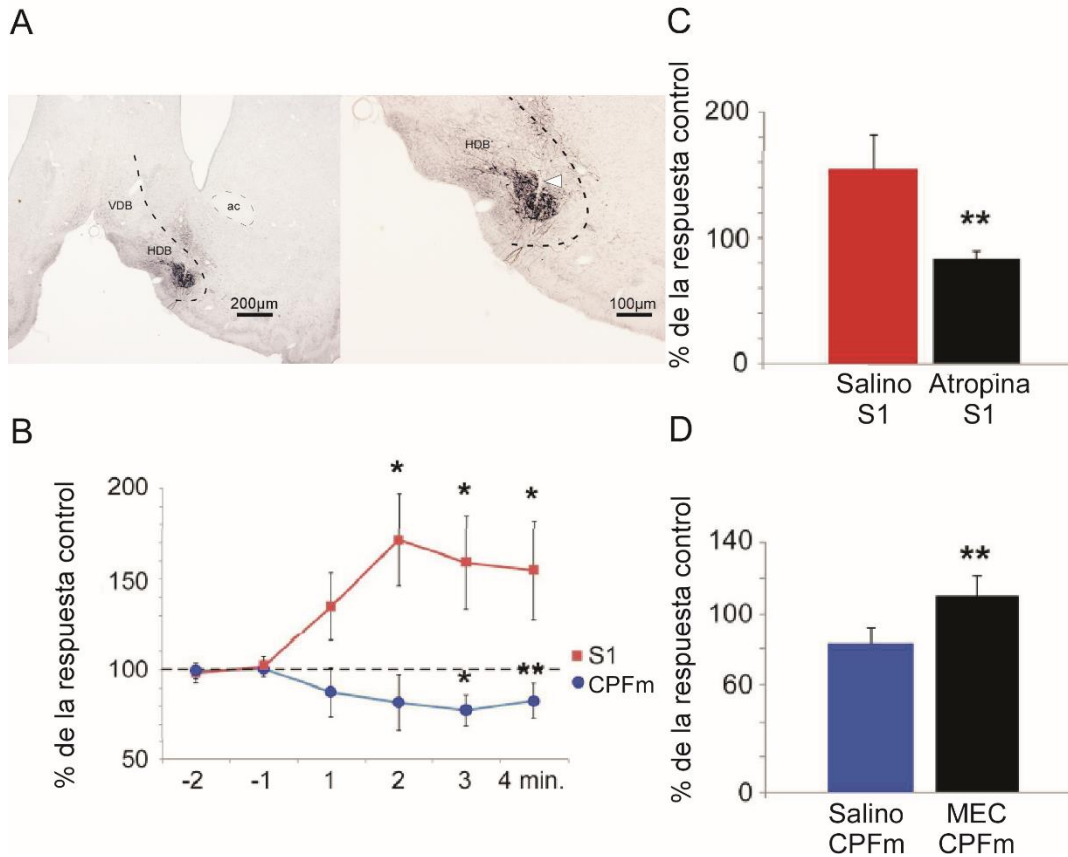


Figura 40, La estimulación optogenética de HDB induce modulación colinérgica del PES en CPFm y S1. A, se muestra el centro de la inyección del virus en HDB, la cabeza de flecha indica el trayecto de la fibra óptica. B, El gráfico muestra las respuestas táctiles en control (2 minutos) y después de la estimulación con luz azul en HDB (4 minutos), la media de los dos controles fue considerado el 100% de la respuesta. Nótese que la estimulación en HDB genera efectos diferentes simultáneos en CPFm y S1, La estimulación de HDB genera una inhibición en CPFm y una facilitación en S1, C, la facilitación de la respuesta en S1, provocada por la estimulación del HDB, es bloqueada por inyección i.p de atropina (5mg/kg) 10 minutos antes de la estimulación. D, La inhibición de la respuesta en CPFm provocada por estimulación del HDB es bloqueada por inyección i.p. de mecamilamina (8mg/kg) 10 minutos antes de la estimulación de HDB. Los asteriscos indican la significación estadística, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, S1: Corteza somestésica primaria, CPFm: Corteza prefrontal medial, HDB: Porción Horizontal de la banda diagonal de Broca, MEC: Mecamilamina, VDB: Porción vertical de la banda diagonal de Broca.

Los efectos inhibitorios encontrados en CPFm fueron bloqueados por la administración i.p. de mecamilamina (1mg/kg), lo cual indica que el efecto inhibitorio inducido por estimulación de HDB esta mediada por activación de receptores nicotínicos ($110\% \pm 3\%$, $n = 6$ ratas, $p < 0,001$, respecto a valores control $83 \pm 9\%$; Figura 40D).

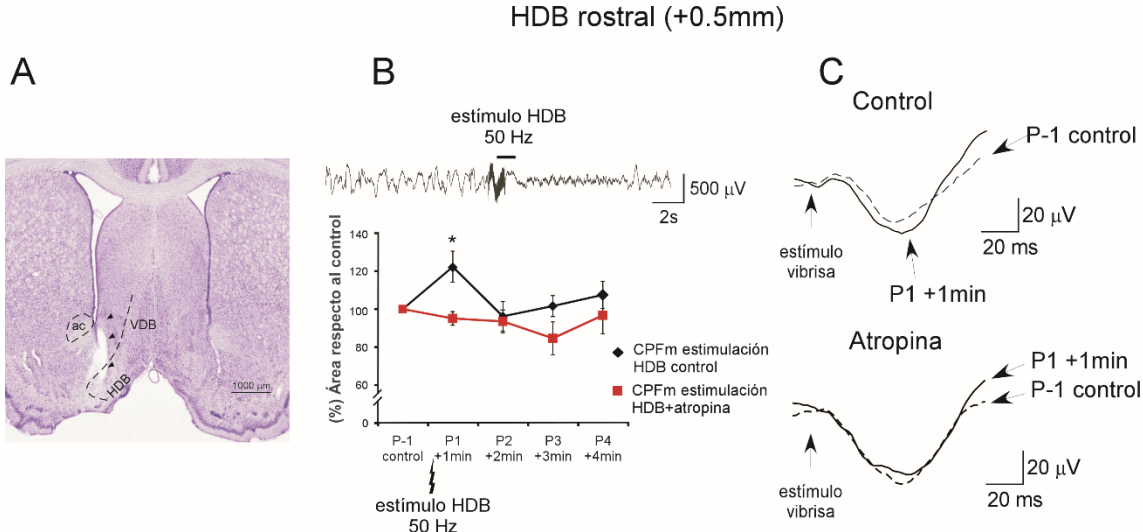


Figura 41. La estimulación eléctrica de la región rostral HDB incrementa el área del PES en la CPFm. A. sección anatómica teñida con violeta de cresilo, en la que se muestra la zona de estimulación, las cabezas de flechas señalan el trayecto de la punta del electrodo bipolar de estimulación. B. en el trazo superior se muestra un registro de campo, 10 segundos previos a la estimulación de la región rostral de HDB y 10 segundos posteriores. En el gráfico inferior se ha cuantificado el porcentaje de cambio del área de la curva del PES durante 4 minutos posteriores (P1, P2, P3, P4) a la estimulación de HDB, en comparación con el PES control previo a la estimulación. C. Ejemplo de PES en control (línea discontinua) y 1 minuto posterior a la estimulación de HDB (línea continua). Los asteriscos indican la diferencia significativa entre el P1 +1min control y P1 +1 min con mecamilamina. AC: comisura anterior, HDB: porción horizontal de la banda diagonal de broca, VDB: porción vertical de la banda diagonal de Broca.

La estimulación eléctrica de las neuronas de la región rostral de HDB (+0,5mm de Bregma; Figura 41A), generó un aumento significativo del área del PES en el primer periodo (1 minuto después de la estimulación de HDB rostral)

respecto al periodo control ($122 \pm 7,49 \%$, $n = 22$, $p = 0,014$). Sin embargo, el efecto generado por la estimulación, no se mantuvo en los periodos P2 (+1 min, $96,2 \pm 7,23\%$, $n = 22$, $p = 0,08$), P3 (+2 min, $101,61 \pm 5,19\%$, $n = 22$, $p = 0,82$) y P4 (+4min, $107,5 \pm 6,27\%$, $n = 22$, $p = 0,93$; Figura 41B).

Se administró atropina (1mg/1Kg, i.p) 10 minutos antes de aplicación del protocolo de estimulación, para determinar si este efecto facilitador de la respuesta somestésica en la CPFm (región correspondiente a PL), era mediado por activación de receptores muscarínicos. La administración de atropina bloqueó el efecto facilitador observado en la respuesta somestésica de la CPFm por estimulación de HDB rostral (periodo P+1, $95,1 \pm 3,58\%$, $n = 11$, $p = 0,23$; Figura 41B). Además, en presencia de atropina no se observaron diferencias significativas en los periodos P2 +2min, ($93,5 \pm 6,01\%$, $n = 11$, $p = 0,37$) P3 + 3min ($84,6 \pm 8,62\%$, $n = 11$, $p = 0,09$) y P4 + 4 min ($96,7 \pm 9,72\%$, $n = 10$, $p = 0,22$), posteriores a la estimulación de HDB en comparación con el periodo P-1 (control con atropina previo a estimulación de HDB rostral).

La estimulación eléctrica de las neuronas de la porción caudal (-0,5mm de bregma) de HDB (Figura 42A), generó cambios diferentes en la CPFm a los generados por la región rostral, concretamente la estimulación de neuronas de la región caudal generó una depresión de la respuesta somestésica de las neuronas de la CPFm desde el primer minuto posterior a la estimulación eléctrica de HDB caudal en comparación con el periodo control (P1 +1min, $74,2 \pm 5,03\%$, $n = 25$, $p < 0,001$), similar a lo observado con la estimulación optogenética. Además, esta depresión de la respuesta se mantuvo durante los periodos P2 + 2min y P3 + 3min, ($77,6 \pm 5,33\%$, $n = 25$, $p < 0,001$ y $77,6 \pm 5,85$, $n = 25$, $p < 0,001$, respectivamente), observándose una tendencia a la recuperación en el periodo P4 + 4min ($88,5 \pm 7,2\%$, $n = 25$, $p = 0,027$; Figura 42B).

Con el objetivo de determinar si la depresión de la respuesta somestésica encontrada en la CPFm por estimulación de la región caudal de HDB, esta mediada por activación de receptores nicotínicos, se administró mecamilamina (1mg/1Kg, i.p), 10 minutos antes de la de la aplicación del protocolo de estimulación. Como puede observarse en la Figura 42B, La administración de

mecamilamina bloqueó el efecto inhibitorio observado sobre la respuesta somestésica en la CPFm durante el periodo P1 +1 min (sin atropina) por estimulación de HDB caudal ($110,2 \pm 11,27$, $n = 12$, $p < 0,001$; Figura 42B)

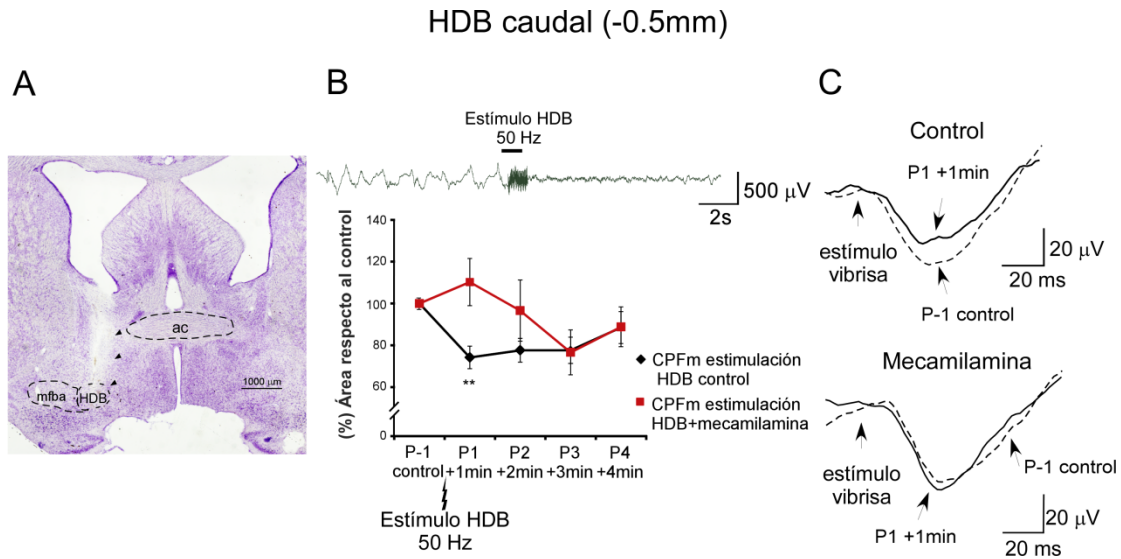


Figura 42. La estimulación eléctrica de la región caudal de HDB reduce el área del PES en la CPFm.
A. sección anatómica teñida con violeta de cresilo, en la que se muestra la zona de estimulación, las cabezas de flechas señalan el trayecto de la punta del electrodo bipolar de estimulación. B. en el trazo superior se muestra un registro de campo, 10 segundos previos a la estimulación de la región caudal de HDB y 10 segundos posteriores. En el gráfico inferior se ha cuantificado el porcentaje de cambio del área de la curva del PES durante 4 minutos posteriores a la estimulación de HDB, en comparación con el PES control previo a la estimulación. C. Ejemplo de PES en control (línea discontinua) y 1 minuto posterior a la estimulación de HDB (línea continua). Los asteriscos indican la diferencia significativa entre el P1 +1min control y P1 +1 min con mecamilamina.

Además, en comparación con el periodo control P-1 (antes de la estimulación de HDB caudal) en condiciones de mecamilamina no se observaron diferencias significativas en los periodos P2 + 2min, ($96,6 \pm 16,60$, $n = 12$, $p = 0,69$), sin embargo, si que se encontró inhibición de la respuesta en el periodo P3 + 3min ($76,6 \pm 10,61\%$, $n = 12$, $p = 0,028$) y P4 ($88,8 \pm 9,49\%$, $n = 12$, $p = 0,22$), posteriores a la estimulación de HDB.

Por tanto, parece existir una segregación funcional en función de la región rostro-caudal de HDB, encontrándose un efecto inhibitorio en la región más caudal de HDB, y que dicha inhibición esta mediada por activación de receptores nicotínicos. Por tanto, para determinar si este efecto inhibitorio mediado por receptores nicotínicos, es debido a un efecto directo sobre las neuronas de la CPFm o por activación de interneuronas parvalbumina positivas, se repitieron los experimentos controles y posteriormente se inyectó

intracorticalmente ω -Agatoxina (0,1 μ l in solución salina, 100nM; Figura 43A) en PL, para bloquear la liberación de GABA de las interneuronas parvalbumina positivas; a continuación se volvieron a registrar los PES en PL y se analizó el efecto de la estimulación de HDB caudal sobre el área de los PES.

Como puede observarse en la Figura 43B en la situación control, la estimulación de HDB caudal redujo la respuesta somestésica en CPFm en el periodo P1 ($55,0 \pm 5,95\%$, $n = 6$, $p = 0,03$), sin embargo, no redujo la respuesta de manera significativa en el periodo P2 ($65,6 \pm 16,94\%$, $n = 6$, $p = 0,15$), pero si lo hizo en el periodo P3 ($47,2 \pm 8,04\%$, $n = 6$, $p = 0,03$) y en el periodo P4 ($66,2 \pm 6,84\%$, $n = 6$, $p = 0,03$). En condiciones de ω -agatoxina en el medio la estimulación de HDB caudal, no redujo la respuesta somestésica en CPFm en el periodo P1 ($91,4 \pm 10,26\%$, $n = 11$, $p = 0,27$), aunque si redujo la respuesta en el periodo P2 ($69,4 \pm 7,65\%$, $n = 11$, $p = 0,004$) y en el periodo P3 ($72,5 \pm 12,02\%$, $n = 11$, $p = 0,042$). En el periodo P4 (+4min) la estimulación de HDB no redujo la respuesta de manera significativa ($82,1 \pm 12,37\%$, $n = 11$, $p = 0,27$).

Cuando comparamos los datos en control con los obtenidos en presencia de la ω -agatoxina la inhibición observada en el periodo P1 fue significativamente menor ($91,4 \pm 10,29\%$, $n = 11$, $p = 0,028$), sin embargo, no hubo diferencias significativas en el resto de los periodos (+ 2min, 69.43 ± 7.21 , $n = 11$, $p = 0,81$; +3min, 72.52 ± 12.02 , $n = 11$, $p = 0,16$; +4 min, 82.11 ± 12.37 , $n = 11$, $p = 0,38$).

Estos resultados sugieren, que la estimulación de HDB caudal genera una activación de interneuronas GABAérgicas PV positivas a través de receptores nicotínicos que afecta a los primeros segundos de la respuesta posterior a la estimulación de HDB caudal pero que no inhibe las respuestas inhibitorias más duraderas.

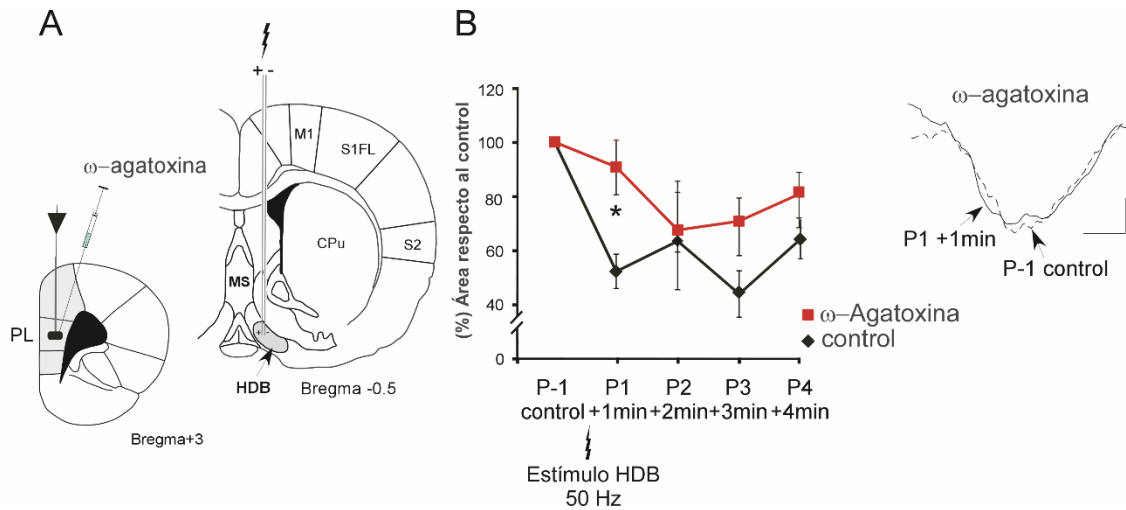


Figura 43. La aplicación de ω -Agatoxina reduce la inhibición generada por estimulación de la región caudal de HDB. A. Imagen anatómica del protocolo de estimulación de HDB y de aplicación de ω -Agatoxina. B. En la gráfica se han cuantificado el porcentaje de cambio del área de la curva de los PES registrados en CPFm (PL) en distintos periodos respecto al periodo P-1, en condiciones control, y en condiciones de ω -Agatoxina. A la derecha de la gráfica se muestra un ejemplo de registro en condiciones de ω -Agatoxina en el medio, tanto en el periodo control (P-1, línea discontinua) como en el periodo siguiente a la estimulación eléctrica de HDB (P1 + 1 minuto, línea continua). El asterisco indica la significación estadística entre el periodo P1 + 1min en condiciones control y en condiciones de ω -Agatoxina en el medio, * = $p < 0,05$. CPu: caudado-putamen, HDB: porción horizontal de la banda diagonal de Broca, M1: corteza motora primaria, MS: septum medial, PL: corteza prefrontal, S1FL: corteza somestésica primaria, área de representación de las extremidades anteriores, S2: corteza somestésica secundaria.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, existe una modulación colinérgica de la respuesta sensorial en la CPFm, por tanto, sería previsible que un aumento de los niveles de ACh, similares a los que ocurren en vigilia generasen cambios en el fenómeno de interferencia sensorial, tanto por una modalidad sensorial diferente (estimulación auditiva), como por estimulación somestésica del lado contralateral. Para evaluar esta hipótesis se repitieron los protocolos de interferencia, utilizándose un pincel para estimular las vibras de lado contrario, como un ruido blanco; esta vez se utilizó una intensidad mayor (60db) para generar una mayor interferencia a través de un cambio de modalidad sensorial, así como en la interferencia somestésica se incrementó la frecuencia de barrido del pincel.

La corteza PL, durante la interferencia somatosensorial, en situación control (sin eserina), mostró una reducción de la respuesta somestésica de $71 \pm 6\%$ ($n = 17$, $p = 0,0013$) respecto a la respuesta en el periodo control, y de $86,6 \pm 6,2\%$ ($n = 17$, $p = 0,06$) durante el periodo de recuperación. En situación de presencia de eserina, durante el periodo de interferencia somatosensorial, la

reducción de la respuesta fue de $76 \pm 4,8\%$ ($n = 12$, $p = 0,006$), y de $88 \pm 5,9\%$ durante el periodo de recuperación, respecto a la respuesta en periodo control; por tanto, durante el periodo de interferencia, la eserina no parece reducir significativamente la interferencia somatosensorial en corteza PL respecto a la situación sin eserina ($p = 0,22$).

En la corteza IL, la interferencia somatosensorial en situación control (sin eserina), mostró una reducción de la respuesta somestésica de $75 \pm 5,8\%$ ($n = 10$, $p = 0,0013$) respecto a la respuesta en el periodo control, y de $94 \pm 10,8\%$ ($n = 10$, $p = 0,37$) durante el periodo de recuperación. En corteza IL, la administración de eserina tuvo un efecto mayor durante el periodo de interferencia somatosensorial; la reducción de la respuesta fue de $90 \pm 8,7\%$ ($n = 12$, $p = 0,145$), y de $96 \pm 5,6\%$ ($p = 0,18$) durante el periodo de recuperación, respecto a la respuesta en periodo control, por tanto, durante el periodo de interferencia, la eserina reduce significativamente la interferencia somatosensorial en corteza IL (respecto a la situación sin eserina, $p = 0,004$).

Cuando se aplicó una interferencia auditiva (ruido blanco, 60dB) la corteza PL redujo su respuesta somestésica durante el periodo de interferencia ($74 \pm 5,1\%$, $n = 16$, $p = 0,0002$). Durante el periodo de recuperación la respuesta fue similar a la respuesta durante el periodo control ($92 \pm 7,8\%$, $n = 16$, $p = 0,085$). Durante la interferencia auditiva la respuesta en PL, fue mayor en situación de eserina ($85 \pm 7,8\%$, $n = 10$, $p = 0,16$) respecto al periodo control, y significativamente mayor respecto a la situación control (sin eserina; $p = 0,01$). Durante el periodo de recuperación la respuesta fue de $88 \pm 6,9\%$ ($n = 16$, $p = 0,16$).

En corteza IL la interferencia auditiva generó una reducción de la respuesta ($74 \pm 4,2\%$, $n = 7$, $p = 0,015$) respecto al periodo control, y de $80 \pm 5,6\%$ ($n = 7$, $p = 0,031$) durante el periodo de recuperación. En la corteza IL la administración de eserina redujo la atenuación de la respuesta ($84 \pm 5,6\%$, $n = 11$, $p = 0,041$) respecto al periodo control; además esta reducción fue significativamente mayor respecto a la situación control (sin eserina, $p = 0,006$). Durante el periodo de recuperación la respuesta fue de $82 \pm 6,9\%$ ($p = 0,051$).

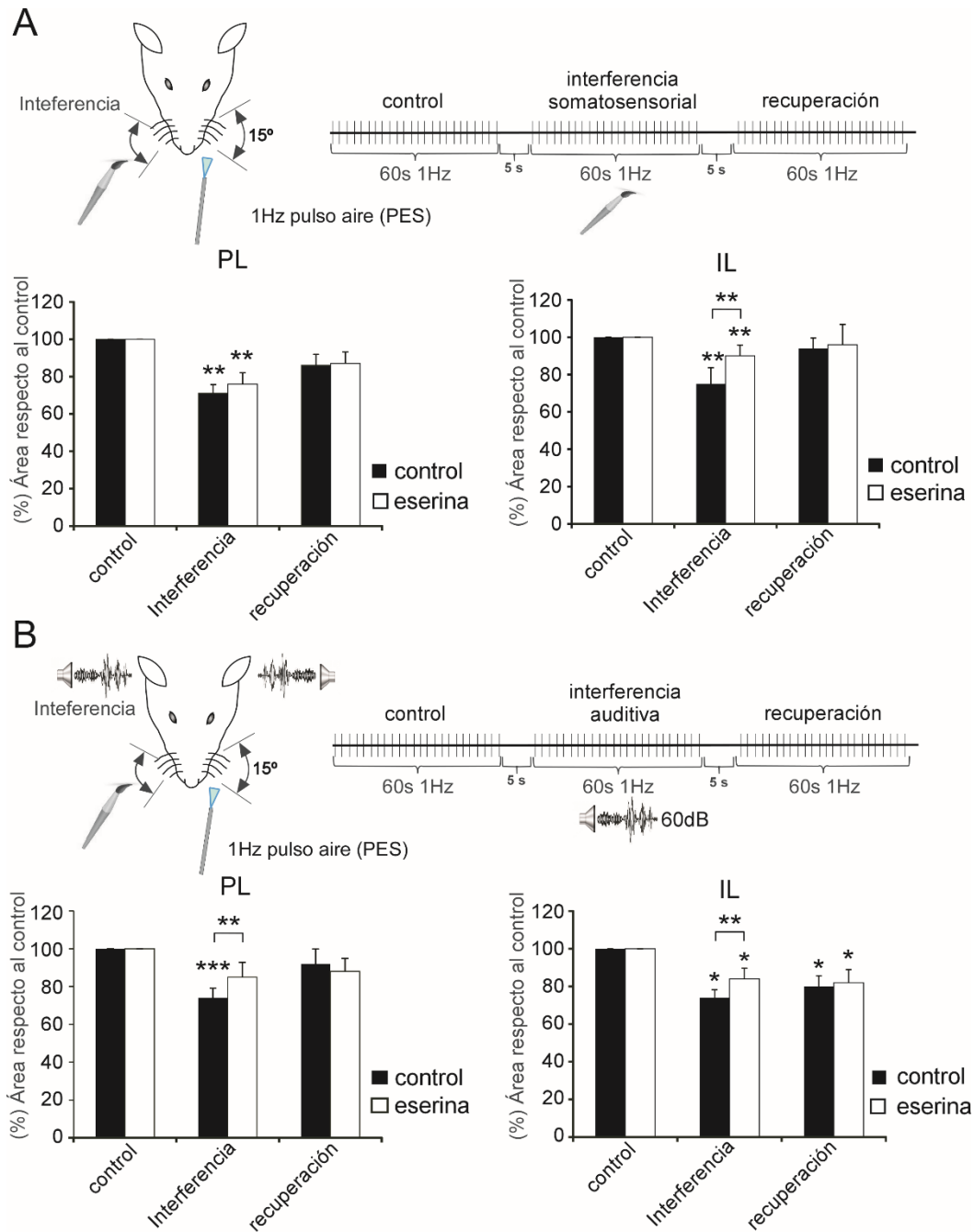


Figura 44. La aplicación de eserina reduce la atenuación generada por el protocolo de interferencia sensorial. A. En el esquema superior se representa un ejemplo del protocolo de interferencia somatosensorial utilizado. En la gráfica inferior izquierda se han cuantificado el porcentaje de cambio del área del PES en PL. La interferencia somatosensorial genera una atenuación de la respuesta tanto en condiciones control, como en condiciones de eserina. En la gráfica inferior derecha se puede observar que en corteza PL la atenuación generada por la interferencia somatosensorial, es significativamente menor en condiciones de eserina. B. en el esquema superior se muestra un ejemplo de protocolo de interferencia auditiva. En la gráfica inferior izquierda se puede observar como la interferencia auditiva es bloqueada por administración de eserina en corteza PL. En la gráfica inferior derecha, la administración de eserina redujo significativamente la interferencia auditiva en corteza IL. Los asteriscos sobre las barras de error, indican las diferencias significativas en comparación con el periodo control. Los asteriscos sobre la caja horizontal indican la diferencia significativa entre condición control y condición eserina. IL: corteza infralímbica, PL: corteza prelímbica.

Por tanto, el aumento generalizado de ACh provocado por la eserina, como método para simular los periodos de activación cortical que ocurren en la vigilia y en el sueño REM, disminuyó en la mayoría de los casos los procesos de interferencia sensorial en la CPFm.

5. DISCUSIÓN

Los resultados mostrados anteriormente demuestran que existe un procesamiento elaborado de la información sensorial en la corteza prefrontal medial. Tanto los procesos de adaptación como de interferencia sensorial o los cambios en la historia previa de estimulación muestran que la corteza prefrontal recibe información sensorial de diferentes modalidades y la elabora de forma compleja para ejecutar diferentes conductas de acuerdo con este procesamiento elaborado. Además, este procesamiento está modulado por los niveles de ACh, mediante la activación de receptores nicotínicos y muscarínicos, lo que permite cambiar este procesamiento sensorial de acuerdo al nivel de atención o aprendizaje, o durante el ciclo vigilia-sueño, procesos que cambian de forma importante los niveles de ACh en corteza.

Nuestros experimentos fueron llevados a cabo bajo anestesia con uretano (ethylcarbamato), que actúa sobre las sinapsis inhibitorias y excitatorias (Hara y Harris, 2002). Erchova y colaboradores (2002) mostraron que las neuronas de la corteza de barriles tienen una tasa menor de disparo a la estimulación de las vibrisas que en ausencia de anestésico. Además, estudios basados con microdiálisis revelan que la liberación de ACh es menor bajo anestesia que en el animal despierto (Bertorelli et al., 1991). Estos datos sugieren que en animales despiertos las respuestas sensoriales y los procesos de plasticidad sensorial pueden ser mayores. Sin embargo, creemos que el uretano no cambia las conclusiones del presente trabajo. Como se ha indicado anteriormente, el aumento de la ACh en el sistema nervioso mediante la inyección de eserina, que podría simular lo que ocurre en vigilia, disminuye la interferencia sensorial pero no la abolió.

Los resultados mostrados acerca de la adaptación de la respuesta en corteza de barriles, indican que la adaptación es una propiedad que aparece en todos los niveles de la vía lemniscal, pero que es mayor en capas 2/3 y capas 5/6 de la corteza de barriles. Los resultados describen dos tipos de neuronas que, pueden representar neuronas piramidales (tipo 1; Manns et al., 2004; De Kock et al., 2007) e interneuronas (tipo 2; McCormick et al., 1985) por las características de su descarga espontánea y de la respuesta a la estimulación táctil.

Se observa que la adaptación de las neuronas tipo 1 ocurre a partir de frecuencias de estimulación por encima de los 2Hz, siendo mayor el nivel de adaptación conforme aumenta la frecuencia de estimulación, sin embargo, en las neuronas tipo 2 no encontramos adaptación. La adaptación de la respuesta, también ocurre en neuronas situadas en los núcleos VPM, y Pr5, aunque es menos pronunciada que las observadas en corteza. En los registros realizados en este estudio en neuronas de Pr5 la adaptación alcanza aproximadamente un 20%, aumentando en VPM hasta el 50% y en la corteza de barriles hasta aproximadamente el 80%. Es interesante destacar que las frecuencias que más producen adaptación de las respuestas son las frecuencias que utilizan los roedores para explorar el entorno. Por tanto, el papel funcional del proceso de adaptación de la respuesta podría ser la alteración de la sensibilidad de las neuronas, con el fin de codificar los estímulos sensoriales de manera más eficiente (Sharpee et al., 2006; Ganmor et al., 2010; Maravall et al., 2007; Maravall et al., 2013) y mejorar la detección de estímulos novedosos mediante una reducción de la respuesta a los estímulos que son frecuentes o irrelevantes (Dragoi et al., 2002; Ulanovsk et al., 2003). La adaptación de la respuesta es menor en presencia de ACh, efecto mediado por activación de receptores muscarínicos, lo que sugiere que la adaptación de la respuesta puede cambiar conforme al nivel de activación cortical o el nivel de atención que está prestando el animal.

En los roedores, la discriminación táctil de objetos y superficies está basada en el movimiento repetitivo de las vibrisas a una frecuencia que oscila entre los 4Hz y los 12Hz (Carvell y Simons, 1990, Fansellow et al., 2001). A la frecuencia de estimulación de 5Hz las neuronas de Pr5 y VPM alcanza una respuesta estacionaria después de unos pocos estímulos y con una pequeña atenuación (ver, Katz et al., 2006), indicando que el núcleo Pr5 se comportaría como una “estación de relevo” en la vía lemniscal (Deschenes et al., 2003). Las neuronas tálamicas de VPM no mostraron una adaptación gradual, dato consistente con estudios extracelulares previos (Hartings et al., 2003; Khatri et al., 2004; Katz et al., 2006).

La adaptación de la respuesta en estructuras subcorticales no puede ser debida a una reducción de las proyecciones corticofugales ya que la

adaptación de las neuronas de Pr5 y de VPM se mantiene después de la inactivación de la corteza de barriles. Además, la comparación de la adaptación de la respuesta existente en la corteza y en VPM sugiere que existen mecanismos intracorticales adicionales cuyo efecto es la adaptación de la respuesta ante un estímulo repetitivo (Chung et al., 2002).

La adaptación de las neuronas corticales ante un estímulo repetitivo es gradual y pronunciada (Castro-Alamancos, 2004; Higley y Contreras, 2006). Se han propuesto diferentes mecanismos, que pueden contribuir a la adaptación cortical de la respuesta sensorial, tanto mecanismos mediados por propiedades intrínsecas de las neuronas (Ahissar et al., 2000; Sanchez-Vives y McCormick, 2000; Castro-Alamancos, 2004; Higley y Contreras, 2006; Diaz-Quesada y Maravall, 2008), como mediados por un aumento de la inhibición que podría reducir la respuesta de las neuronas piramidales ante un tren de estímulos (Dealy y Tolhurst, 1974). Nuestros resultados muestran que las neuronas cuyas características son compatibles con neuronas inhibitorias (tipo 2) no muestran adaptación a 5Hz, frecuencia que genera adaptación en neuronas cuyas características son compatibles con neuronas piramidales (tipo 1). Además, la aplicación de un agonista de los receptores GABA_A no modifica la adaptación encontrada en neuronas tipo 1 por tanto, estos datos indican que la inhibición no parece ser responsable de la adaptación encontrada en neuronas tipo 1 en la corteza de barriles. Estudios electrofisiológicos previos realizados *in vitro* e *in vivo*, muestran que las neuronas inhibitorias adaptan más rápidamente que las neuronas excitatorias (Chung et al., 2002; Gabernet et al., 2005; Heiss et al., 2008) sin embargo, esta contradicción puede ser debida a las altas frecuencias de estimulación que se usan en estos estudios (> 10Hz), que no contradicen la posibilidad que las neuronas clasificadas en este estudio como tipo 2, sean interneuronas.

La literatura previa indica que la depresión sináptica es la responsable de la adaptación sensorial. Es sabido que las neuronas trigeminales son capaces de transmitir de forma fiable a altas frecuencias de estimulación (Deschenes et al., 2003). Sin embargo, la adaptación encontrada en neuronas tálamicas a altas frecuencias puede surgir como consecuencia de una depresión de las sinapsis trigémino-tálamicas (Castro-Alamancos, 2002b; Deschenes et al., 2003; Katz et

al., 2006; Ganmor et al., 2010). Los datos mostrados en el presente estudio sobre la adaptación de la respuesta sensorial en neuronas tálamicas y corticales es perfectamente compatible con la visión actual, que sugiere que la depresión sináptica en las sinapsis trigémino-tálamicas y tálamo-corticales juega un papel clave en la adaptación cortical (Chung et al., 2002; Katz et al., 2006; Ganmor et al., 2010).

El uretano utilizado como método de anestesia en el presente estudio también puede estar jugando un papel clave en la adaptación ya que aumentaría la inhibición y ejercería como filtro pasa bajo de las frecuencias de estimulación y las respuestas más rápidas tanto en las neuronas tálamicas como en las neuronas corticales (Castro-Alamancos, 2002b). Sin embargo, a las frecuencias de estimulación que hemos utilizado (<10Hz) observamos una adaptación importante, indicando que el uretano no modificó de forma importante este proceso.

Este proceso de adaptación no es exclusivo de la vía lemniscal o de las cortezas sensoriales primarias. La CPFm también muestra una importante atenuación de las respuestas cuando se aplica un estímulo repetitivo a frecuencias mayores de 1 Hz, tanto si el estímulo es táctil como si era auditivo, aunque la atenuación de la respuesta fue siempre mayor en la corteza sensorial primaria.

La aplicación de agonistas de los receptores muscarínicos suprime la adaptación de la respuesta de las neuronas registradas *in vitro* en rodajas corticales mediante el bloqueo de corrientes de K^+ (McCormick y Price, 1986; Barkai y Hasselmo, 1994; Krnjevic, 2004). Nuestros resultados sugieren que los cambios observados en la adaptación por la aplicación de ACh son debidos a la activación de receptores muscarínicos ya que el efecto fue completamente bloqueado por la aplicación de atropina. Si bien, no podemos descartar por completo la participación de receptores nicotínicos, ya que la aplicación de antagonistas no selectivos de los receptores muscarínicos como es la atropina, no solo bloquea los receptores muscarínicos postsinápticos, sino que también estarían antagonizando los receptores M2 presentes en los terminales presinápticos (e.g Herzog, 2003), y por tanto aumentando la liberación de ACh,

lo cual trae consigo un aumento de la liberación de ACh y la estimulación indirecta los receptores nicotínicos (Demeter y Sarter, 2013). Además, diversos estudios han mostrado que la aplicación de nicotina mejora las funciones cognitivas (Levin et al., 2006b). Teniendo en cuenta que en animales anestesiados el nivel de ACh es bajo, nuestros resultados no pueden excluir la participación de receptores nicotínicos en periodos con niveles de ACh más elevados.

El efecto de la ACh fue mayor en capas 5/6 que en capas 2/3, este efecto puede ser debido a la mayor densidad de fibras colinérgicas presentes en capa 1 y 5 en comparación con las existentes en capas 2/3 y 4 (Houser et al., 1985).

Una función de la ACh, es la regulación del estado de activación cortical, facilitando la aparición de oscilaciones rápidas en la actividad cortical (Buzsaki et al., 1988; Metherate et al., 1992; Nuñez et al., 1996; Duque et al., 2000; Kuo et al., 2009). Los incrementos de ACh y las activaciones del EEG asociados a estados específicos (Vigilia, atención o sueño MOR), ejercen efectos profundos sobre las respuestas sensoriales (Levin et al., 2006a, b; Kuo et al., 2009). Varios estudios han demostrado que la adaptación cortical es menos pronunciada en vigilia que en animales anestesiados o durante la vigilia tranquila o estados de sueño de ondas lentas (Simons et al., 1992; Castro-Alamancos, 2004; Von der Behrenes et al., 2009). En consecuencia, la adaptación de la respuesta en la vía somatosensorial, puede modular la transmisión sensorial desde el tronco hasta la corteza, y puede cambiar acorde a los niveles de ACh, que pueden variar de acuerdo al estado conductual del animal (Sarter et al., 2014).

Si bien como se dijo anteriormente existen varias propuestas para tratar de explicar el mecanismo que subyace al fenómeno de la adaptación neuronal, por ejemplo, el aumento de la inhibición, que, en nuestro estudio, no se sustenta con los resultados encontrados. Otra posibilidad es la depresión de las sinápsis tálamo-corticales o un aumento de la inhibición en las neuronas tálamicas, mediadas por activación de neuronas del núcleo reticular talámico. Una de las estructuras más importantes de la corteza cerebral, que controlan en parte la

actividad del núcleo reticular tálamico es la corteza prefrontal que, como discutimos más adelante, también presenta una importante adaptación.

Por lo anteriormente expuesto, la corteza cerebral, y en menor medida áreas subcorticales, pueden modificar su respuesta dependiendo del patrón de estimulación. Sin embargo, estos cambios pueden pensarse que son pequeños si uno piensa que las respuestas sensoriales cambian dependiendo del estado conductual del individuo o el contenido informativo del estímulo. Por esta razón estudiamos las respuestas sensoriales en la CPFm y las modificaciones que ocurren en ella de acuerdo a las características de la estimulación. Como se ha mostrado en la Sección de Resultados, los cambios que se observaron en la CPFm son mayores en la corteza somestésica o auditiva primaria.

Nuestros resultados muestran que la CPFm, concretamente la corteza IL y en menor medida la corteza PL reducen el área del potencial evocado dependiendo de si existe un estímulo que interfiere en la respuesta del estímulo principal, o cuando ocurre un cambio en la secuencia de estimulación reciente. Sin embargo, estos cambios en la secuencia de estimulación no fueron detectados por la región dorsal de la corteza prefrontal ni por la corteza S1. Cuando se aplicó un distractor o se introdujo un cambio en el patrón de estimulación que podría ser “novedoso”, las neuronas de la CPFm redujeron su respuesta. Estos efectos pueden estar mediados en parte por activación de interneuronas inhibitoria positivas para PV, ya que los efectos fueron bloqueados por aplicación de ω -agatoxina (antagonista de los canales de calcio voltaje dependientes P/Q).

Para que la CPFm pueda participar en el procesamiento de la información sensorial debe recibir proyecciones desde áreas corticales sensoriales. Estudios previos han demostrado proyecciones desde cortezas M1, M2, S1, S2 hacia la corteza prefrontal, siguiendo un orden topográfico (Hoover y Vertes, 2007; Bedwell et al., 2014 y 2015; Zaborszky et al., 2015). De acuerdo con estos resultados, nuestros resultados con trazadores retrógrados sugieren que tanto las entradas somestésicas como auditivas llegan a la corteza prefrontal dorsal (AGm-ACC) desde el área S2 y desde las cortezas asociativas temporales. La corteza prefrontal ventral (PL-IL) puede recibir esta información

sensorial a través de las densas conexiones existentes con la corteza prefrontal dorsal. En consecuencia, la región dorso-lateral y dorso-medial de la CPF, están más asociadas con cortezas sensoriales que la corteza ventro-medial (Hoover y Vertes, 2007). Las áreas corticales AGm-ACC podrían tener un papel funcional como estación de relevo de información sensorial, comunicando las cortezas sensoriales con la región ventral de la corteza prefrontal.

Es probable, que por esta razón las características de las respuestas táctiles encontradas en AGm-ACC sean más similares a las respuestas de las neuronas de S1 que las de PL-IL que en cambio muestran cambios más complejos en las respuestas táctiles acordes al contexto de la estimulación. De acuerdo con estos hallazgos, la aplicación de muscimol en corteza AGm-ACC, tiene como consecuencia una reducción del PES en la corteza prefrontal ventral, sugiriendo que la información sensorial que llega a la corteza prefrontal medial ventral (PL-IL) tiene, al menos en parte, su origen en la corteza prefrontal medial dorsal (AGm-ACC).

Estudios recientes realizados con trazadores anterógrados y retrogrados, también revelan la existencia de proyecciones desde cortezas somatosensoriales a la corteza orbito-medial, orbital-ventral y orbital-lateral (Bedwell et al., 2014 y 2015). Estas áreas tienen densas proyecciones con la corteza prefrontal medial ventral (PL-IL), por tanto, es posible que parte de la información sensorial también llegue a través de las cortezas orbitales. Otro estudio como el de Bohon y Wiest en 2014 demuestran la existencia de respuestas auditivas en cortezas medio-dorsales de la corteza prefrontal. Por tanto, todos estos datos sugieren que la información sensorial puede llegar a la corteza prefrontal a través de diferentes vías. La corteza prefrontal puede recibir información sensorial a través de vías mediales y laterales desde áreas corticales diversas (Zingg et al., 2014), dando lugar a la integración sensorial compleja en la corteza prefrontal de distintos aspectos del estímulo sensorial y su modulación por la información del medio externo y también del medio interno (Fryszak and Neafsey 1994; Tabares y Correa, 2006). Estos resultados muestran que las diferentes regiones de la CPFm juegan diferentes papeles en el procesamiento sensorial. De acuerdo con esta hipótesis, los trabajos publicados por Delatour y Gisquet-Verrier (1996 y 1999) indican que

las lesiones de las cortezas PL/IL causan una disrupción de la atención, y además estas áreas juegan un papel clave en procesos preparatorios de la ejecución de tareas, mientras que las lesiones en ACC dificultan la ejecución de las mimas (Heidbreder y Groenewegen, 2003; Seamans et al., 2008; Pezze et al., 2014). Además, las regiones dorsales han sido relacionadas con varios comportamientos motores, mientras que las regiones ventrales, con procesos emocionales, cognitivos y mnemónicos del comportamiento (Heidbreder y Groenewegen, 2003; Vertes, 2006).

Nuestros resultados también muestran proyecciones desde la región más caudal del núcleo Pom del tálamo hacia la región dorsal de la CPFm; esta región en el núcleo Pom ha sido descrita como un área multisensorial (Ledoux et al., 1987); por tanto, parte de la información sensorial puede llegar a la corteza prefrontal directamente desde la región más caudal del núcleo Pom del tálamo. Este hallazgo puede explicar porque la inactivación con lidocaina de la corteza S1 no abole por completo la respuesta sensorial en la CPFm.

Como se ha indicado, la corteza prefrontal muestra cambios en sus respuestas según el protocolo de estimulación o la aplicación de un distractor, tanto somestésico (de la misma modalidad sensorial) o auditivo (de distinta modalidad sensorial). Estos cambios no se observaron en la corteza somestésica primaria. Estudios previos de Alenda y Nuñez (2004 y 2007) demostraron la existencia de interferencia sensorial en la corteza somatosensorial. Esta contradicción puede ser debida al tipo de anestesia (uretano vs pentobarbital) o al tipo de respuesta estudiada (poblacional vs unitaria). Imada y colaboradores (2013), encontraron respuestas mayores a tonos infrecuentes, tanto en corteza prefrontal como corteza parietal de la rata en vigilia, lo que indica que las respuestas en estas cortezas presentan propiedades de detección de estímulos novedosos (Imada et al., 2013). Sus resultados indican que el aumento de la respuesta en respuesta a estímulos infrecuentes no puede explicarse por las propiedades de la respuesta neural específica del estímulo de las neuronas frontales o parietales y deben ser consideradas como una verdadera detección de la desviación, que refleja una comparación del estímulo, dentro de un contexto específico de historia de estimulación reciente (Imada et al., 2013). Nuestros experimentos también

muestran que la aparición de un cambio en la secuencia de estimulación, por ejemplo, un aumento de la frecuencia de estimulación durante un periodo corto de tiempo, provoca la atenuación de las respuestas a las vibrisas en las cortezas PL/IL. En nuestro caso la rata estaba anestesiada por lo que no podemos asegurar que estas áreas de la CPFm estén detectando estímulos novedosos o infrecuentes.

Estas reducciones en la respuesta táctil son perfectamente compatibles con la adaptación neuronal de la respuesta sensorial o por inhibición a través de interneuronas GABAérgicas. Alenda y Nuñez (2004) demostraron que la bicuculina (antagonista selectivo de los receptores GABA_A) bloqueó la interferencia sensorial encontrada en la corteza S1. Para verificar la hipótesis de que la inhibición puede ser importante en los cambios observados en la CPFm aplicamos ω -agatoxina, cuya acción bloquea los canales de calcio dependientes de voltaje Cav2.1 (tipo P/Q) que se expresan interneuronas PV, y por tanto reduce la liberación de GABA (Toledo-Rodriguez et al., 2004; Hefft y Jonas, 2005; Zaitsev et al., 2007). Las células GABAérgicas en cesto son positivas para PV y hacen sinapsis con la región perisomática y dendritas proximales de las células piramidales; su inhibición perisomática regula el disparo potencial de acción de una extensa población de neuronas piramidales en la CPFm (Courtin et al., 2014; Zhang et al., 2015). Estos autores demostraron que la lesión de un nervio periférico inhibió el disparo de las neuronas piramidales como consecuencia de una inhibición “feed-forward” mediada por interneuronas GABAérgicas positivas para PV. En consonancia, la aplicación de ω -agatoxina en la corteza prefrontal aumentó el área del PES, efecto que sugiere que las interneuronas GABAérgicas positivas para PV, pueden modular las respuestas sensoriales en la CPFm. Las interneuronas positivas para PV han sido asociadas a diferentes procesos en la corteza, tales como la memoria a corto plazo (Rossi et al., 2012), la expresión de respuestas de miedo (Courtin et al., 2014) y la sincronización en la banda de frecuencias gamma (Sohal, 2012; Kim et al., 2016). De acuerdo con lo anterior, nuestros resultados demuestran que la interferencia sensorial o los cambios en las secuencias de estimulación no reducen el área del potencial evocado cuando la

ω -agatoxina fue aplicada en las cortezas PL/IL, indicando que este tipo de interneuronas GABAérgicas pueden estar implicadas en estos procesos.

Nuestros resultados también muestran que la intensidad del estímulo distractor es importante para determinar la presencia de interferencia sensorial. Con una intensidad de 50 dB de estímulo distractor auditivo no se observan diferencias significativas en la corteza PL (Figura 35), en cambio las diferencias fueron significativas cuando la intensidad del distractor se incrementó en 10 dB (Figura 44). Lo mismo se observó cuando el distractor fue la aplicación de un estímulo en la vibras contralaterales, pero en este caso no pudo ser cuantificado. Un aumento de la intensidad del distractor permitió observar cambios significativos en algunas áreas, pero en ningún caso permitió detectar nuevas áreas corticales que fueran afectadas. Por ejemplo, la corteza S1 nunca mostró interferencia sensorial con un estímulo auditivo, aunque aumentáramos mucho su intensidad.

Teniendo en cuenta nuestros resultados y los obtenidos por otros autores resulta evidente que la corteza prefrontal existe un procesamiento sensorial más elaborado que en la corteza somatosensorial primaria. Por ejemplo, en la corteza prefrontal existe interferencia sensorial provocada por estímulos de diferentes modalidades sensoriales (somestésica y auditiva), mientras que en la corteza somestésica no existía interferencia entre estímulos somestésicos y visuales (Alenda y Nuñez 2004). Por tanto, la corteza prefrontal parece jugar un papel clave en el procesamiento sensorial, que puede tener importantes consecuencias en procesos de atención, memoria y aprendizaje. Puede ejercer un mecanismo “top-down” de regulación del procesamiento sensorial influenciando otras áreas corticales o estaciones de relevo de las vías sensoriales.

La ACh juega un papel clave en estructuras asociativas como la corteza prefrontal medial, donde existen unas respuestas sensoriales complejas. Este papel lo juega gracias a las importantes conexiones entre el prosencefalo basal y la CPFm (Bloem et al., 2014a). Hemos observado que el incremento de los niveles de ACh tras la aplicación i.p de la eserina, produce un aumento de la

actividad espontanea en la CPFm. Debido a la larga duración del efecto, sería esperable que este efecto fuese a través de la activación de receptores muscarínicos en la CPFm. El área de los potenciales evocados somestésicos también estaba incrementada, lo cual sugiere que las respuestas sensoriales están aumentadas en condiciones de alerta en comparación con las condiciones de anestesia profunda.

Además, la tinción para la reacción enzimática de la acetilcolinesterasa muestra una mayor actividad en la CPFm ventral, concretamente en PL e IL, donde los efectos de la eserina fueron mayores en nuestros experimentos. Existe una conexión bidireccional muy importante entre la CPFm y el prosencéfalo basal, fuente de la ACh a la corteza cerebral, organizada topográficamente (Hoover y Vertes, 2007; Bedwell et al., 2014; Bedwell et al., 2015; Zaborszky et al., 2015). La mayor parte de la proyección colinérgica desde el prosencéfalo basal procede del área HDB. Su estimulación eléctrica o con técnicas de optogenética provocó cambios importantes en las respuestas sensoriales registradas en la CPFm mediante la activación de receptores nicotínicos y muscarínicos. Esta conexión ha sido muy estudiada porque puede ser fundamental en la modulación de los procesos de aprendizaje, atención y memoria (Groenewegen y Uylings, 2000; Dalley et al., 2004; Wise, 2008; Paolone et al., 2012; Bloem et al., 2014a).

Como se ilustra en los Resultados, existe una gran heterogeneidad en los efectos de la estimulación de diferentes regiones a lo largo del eje rostro-caudal de HDB sobre los potenciales somestésicos en CPFm. La estimulación de las regiones más rostrales (+0.5mm), producen una facilitación de los PES registrados en la CPFm, a través por la activación de receptores muscarínicos, mientras que las regiones caudales (-0.5mm) producen una inhibición, mediada por activación de receptores nicotínicos. Además, la estimulación optogenética genera diferentes efectos sobre áreas distintas, facilitando la respuesta en S1 e inhibiendo la respuesta en CPFm, lo cual sugiere que diferentes grupos neuronales colinérgicos en el prosencéfalo basal pueden modular de forma diferente las respuestas en la CPFm, probablemente porque estén proyectando a regiones o capas corticales diferentes. Además, la literatura aporta datos acerca de una segregación anatómica dentro de HDB (Bloem et al., 2014a) que

da lugar a proyecciones independientes hacia la CPFm, que apoyaría los resultados encontrados en la presente Tesis.

La heterogeneidad en la distribución de receptores colinérgicos en la CPFm de la rata podría explicar la heterogeneidad de los resultados que hemos obtenido (Bloem et al., 2014b). El efecto colinérgico mediado por receptores nicotínicos recae principalmente sobre las interneuronas que expresan receptores nicotínicos en capas 2/3, mientras que los efectos muscarínicos en estas capas corticales ocurren en las neuronas piramidales. Sin embargo, en las capas 5/6 tanto las interneuronas como las neuronas piramidales expresan receptores nicotínicos. De acuerdo con estos datos, el efecto inhibitorio que hemos observado sobre los PES por estimulación de la región caudal del HDB está mediado por activación de receptores nicotínicos presentes en interneuronas parvalbumina positivas ya que la administración en CPFm de ω -agatoxina, reduce significativamente el efecto inhibitorio sobre los potenciales somestésicos en CPFm.

Teniendo en cuenta que la actividad colinérgica mediada por receptores nicotínicos en capas 2/3 ocurre principalmente sobre interneuronas parvalbumina, cabría esperar este mecanismo redunde en una mejora de la atención a través inhibir la información lateral, favoreciendo el procesamiento de las entradas tálamicas, como han sugerido algunos autores (Verhoog et al., 2016). Además existen números estudios acerca de la importancia de las interneuronas parvalbumina de la CPFm en la generación del ritmo gamma en rata durante tareas que demandan atención a diferentes estímulos (Kim et al., 2016). En experimentos de optogenética, mediante la inducción del ritmo gamma en neuronas parvalbumina, en la corteza prefrontal medial, se ha demostrado tener efectos “pro-cognitivos” mejorando la flexibilidad cognitiva a largo plazo (Cho et al., 2015). La inactivación de las neuronas PV tiene efectos perjudiciales en la conducta dirigida a una meta (Kim et al., 2016). Todo esto parece indicar que una reducción de la inhibición mediada por interneuronas PV impide la generación de un ritmo gamma adecuado, la sincronización precisa y la modulación local de las neuronas piramidales y por tanto la transmisión de la información (Kim et al., 2016). Por tanto, tanto nuestros resultados como los obtenidos por otros autores indican que las neuronas

positivas para PV pueden jugar un papel muy importante en muchos de los procesos que ocurren en la CPFm.

El aumento de ACh en la corteza cerebral provocado por la administración de eserina redujo significativamente la interferencia sensorial, lo que podría indicar que la ACh favorecería la atención a múltiples estímulos, “no se distraería fácilmente”, en comparación con los niveles existentes en condiciones control.

Como se comentó en la introducción de la presente Tesis, se ha propuesto que la ACh puede estar actuando a través de dos mecanismos: uno sería una actividad tónica y más duradera en el tiempo, y por tanto aumentando la excitabilidad de la red neuronal, que podrían asemejarse a lo que ocurriría en un estado de mayor “arousal” cortical, o al efecto simulado en nuestros experimentos mediante inyección de eserina. Otro mecanismo podría ser mediante una actividad fásica de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, que sería dependiente de las demandas atencionales del contexto, como la presentación de claves atencionales, tal y como demuestra el grupo de Martín Sarter en varios estudios de microdialisis (Parikh et al., 2007; Howe et al., 2013) y como han apoyado otros autores (Bloem et al., 2014b). Presumiblemente sería esperable que este aumento puntual de actividad colinérgica, la modulación de las respuestas sensoriales en CPFm fuese diferente.

6. CONCLUSIONES

1. Desde las primeras estaciones de la vía lemniscal existe una adaptación de la respuesta a un estímulo repetitivo, tanto en el núcleo Pr5 como en VPM, siendo especialmente intensa en la corteza de barriles. Este efecto no está mediado por una influencia corticofugal ni puede atribuirse a un aumento de la inhibición local.
2. La aplicación intracortical de acetilcolina en la corteza de barriles disminuye la adaptación de la respuesta táctil repetitiva tanto en capas 2/3 como en capas 5/6, siendo este efecto colinérgico mediado por la activación de receptores muscarínicos. Por tanto, el proceso de adaptación de las respuestas sensoriales en la corteza S1 es modulado por los niveles de ACh.
3. Existen respuestas sensoriales en la CPFm, que también muestran adaptación a la aplicación de un estímulo repetitivo. Dentro de la CPFm, la región dorsal actuaría como nexo de unión entre cortezas sensoriales y la región ventral de la CPFm. En cambio, la región ventral de la CPFm detecta cambios complejos en los parámetros de la estimulación como la frecuencia de estimulación, cambios en la secuencia de estimulación y la inclusión o interferencia con estímulos de la misma o distinta modalidad sensorial.
4. La detección de los cambios en las frecuencias de estimulación y la interferencia sensorial observada en la CPFm es abolida por el bloqueo de la liberación de GABA_A desde las interneuronas PV positivas, sugiriendo que estas interneuronas pueden ser muy importantes en el procesamiento sensorial que ocurre en la CPFm.
5. El aumento de los niveles de ACh facilita la respuesta evocada por estimulación de las vibras en la región ventral de la CPFm concretamente en corteza PL e IL así como en la corteza de barriles.
6. Las neuronas de la porción horizontal de la banda diagonal de Broca están segregadas funcionalmente en eje rostro-caudal, ya que los

efectos son diferentes si se estimula la zona rostral o caudal de este núcleo. Los efectos inhibitorios fueron mediados por la activación de receptores nicotínicos mientras que los efectos excitadores fueron mediados por receptores muscarínicos. El efecto inhibitorio por estimulación del prosencéfalo basal fue mediado por receptores nicotínicos que podrían estar localizados en interneuronas inhibitorias ya que su efecto se bloqueó por drogas que afectaron a la liberación de GABA por las interneuronas positivas para parvalbumina.

7. El aumento de la acetilcolina en corteza prefrontal medial disminuyó el efecto de la interferencia sensorial principalmente en la corteza IL, indicando que los niveles de acetilcolina en la corteza prefrontal pueden ser importantes en la modulación de los procesos de procesamiento sensorial que ocurren en la CPFm.

7. ABREVIATURAS

- ACC = corteza cingular anterior
- ACh = acetilcolina
- AGm = corteza agranular medial
- AGm-ACC = Corteza agranular medial + Corteza cingular anterior
- Au1 = corteza auditiva primaria,
- AuD = corteza auditiva
- AuD = corteza auditiva secundaria región dorsal
- AuV = corteza auditiva secundaria región ventral
- BLA = núcleo basolateral anterior de la amígdala
- BLP = núcleo basolateral posterior de la amígdala
- CA1 = corpus amonis 1
- CA3 = Corpus amonis 3
- CM = núcleo centro-mediano del tálamo
- CPF = corteza prefrontal
- CPFm = corteza prefrontal medial
- DI = corteza insular disgranular
- DLG = núcleo geniculado lateral dorsal
- DM = núcleo dorso-medial del tálamo
- Ect = corteza ectorrinal, GI: corteza insular granular
- HDB = Porción horizontal de la banda diagonal de Broca
- Hz = Hercio
- Hz = Herzios
- IL = infralímbica
- LP = núcleo lateral posterior del tálamo
- LV = ventrículo lateral
- M1= corteza motora primaria
- M2 = corteza motora secundaria
- mAChR = Receptor muscarínico
- MD = núcleo dorso-mediano del tálamo
- Mt = tracto mamilotalámico
- nAChR = Receptor nicotínico
- Or = estrato oriens del hipocampo
- PEA = Potencial evocado auditivo
- PES = Potencial evocado somestésico
- PF = núcleo parafascicular
- PL = prelímbica
- Po = núcleo posterior del tálamo
- POm = Núcleo Posterior medial del Tálamo
- Pr5 = núcleo principal del tálamo

- PRh = corteza peririnal
- PSTH = Histograma Peri-estímulo
- PtPD = corteza parietal posterior dorsal
- PV = Parvalbumina
- PVG = sustancia gris periventricular
- Re = núcleo reuniens del tálamo
- RS = corteza retrosplenial dorsal
- S1 = Corteza somatosensorial primaria
- S1Bf = Corteza somatosensorial primaria zona de barriles, representación de vibrisas
- S2 = corteza somestésica secundaria
- Str = estriado
- VDB = Porción Vertical de la banda diagonal de Broca
- VPL = núcleo ventral postero-lateral del tálamo
- VPM = Núcleo ventro-medial del tálamo

8. BIBLIOGRAFÍA

Ahissar E, Sosnik R, Haidarliu S, (2000) Transformation from temporal to rate coding in a somatosensory thalamocortical pathway. *Nature*. 406:302–306.

Ahissar E, Sosnik R, Bagdasarian K, Haidarliu S, (2001) Temporal frequency of whisker movement. II. Laminar organization of cortical representations *J. Neurophysiol.*, 86: 354–367.

Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW, (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 89:73–120,

Alcaraz F, Marchand AR, Courtand G, Coutureau E, Wolff M (2016) Parallel inputs from the mediodorsal thalamus to the prefrontal cortex in the rat. *Eur J. Neurosci.* 44:1972-86.

Alenda A, Nuñez A, (2004) Sensory-interference in rat primary somatosensory cortical neurons. *Eur. J. Neurosci.* 19:766–770,

Alenda A, Nuñez A (2007) Cholinergic modulation of sensory interference in rat primary somatosensory cortical neurons. *Brain Res.* 1133:158–167.

Alitto, H. J., y Dan, Y. (2013). Cell-type-specific modulation of neocortical activity by basal forebrain input. *Front. Syst. Neurosci.* 6: 79.

Alkondon M, Pereira EF, Eisenberg HM, Albuquerque EX (2000) Nicotinic receptor activation in human cerebral cortical interneurons: a mechanism for inhibition and disinhibition of neuronal networks. *J. Neurosci.* 20:66–75.

Alloway KD (2008) Information processing streams in rodent barrel cortex: the differential functions of barrel and septal circuits. *Cereb. Cortex.* 18:979- 989.

Arabzadeh E, Zorzin E, Diamond ME (2005) Neuronal encoding of texture in the whisker sensory pathway. *PLoS Biol.* 3, e17.

Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsáki G, Cauli B, De felipe J, Fairén A, Feldmeyer D, Fishell G, Fregnac Y, Freund TF, Gardner D, Gardner EP, Goldberg JH, Helmstaedter M, Hestrin S, Karube F, Kisvárdy ZF, Lambolez B, Lewis DA, Marin O, Markram H, Muñoz A, Packer A, Petersen CC, Rockland KS, Rossier J, Rudy B, Somogyi P, Staiger JF, Tamas G, Thomson AM, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, West DC, Yuste R. (2008) Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci.* 2008 9: 557-68.

Bailey CDC, Alves NC, Nashmi R, De Biasi M, Lambe EK (2012) Nicotinic $\alpha 5$ subunits drive developmental changes in the activation and morphology of prefrontal cortex layer VI neurons. *Biol. Psychiatry.* 71:120–128.

Baranyi A, Szente MB, Woody CD (1993a) Electrophysiological characterization of different types of neurons recorded *in vivo* in the motor cortex of the cat. I. Patterns of firing activity and synaptic responses. *J Neurophysiol.* 69:1850-1864.

Baranyi A, Szente MB, Woody CD (1993b) Electrophysiological characterization of different types of neurons recorded *in vivo* in the motor cortex of the cat. II.

Membrane parameters, action potentials, current-induced voltage responses and electrotonic structures. *J Neurophysiol.* 69:1865-1879.

Barbas H, Garcia-Cabezas MA (2016) How the prefrontal executive got its stripes. *Current opinion in Neurobiology.* 40:125-134.

Barbas H, Ghasghaei HT, Rempel-clower NL, Xiao D (2002) Anatomic basis of functional specialization in prefrontal cortices in primates: *Handbook of neuropsychology.* 7:1-27.

Barbas H¹, Pandya DN (1989) Architecture and intrinsic connections of the prefrontal cortex in the rhesus monkey. *J Comp Neurol.* 286: 353-75.

Barkai E, Hasselmo ME (1994) Modulation of the input/output function of rat piriform cortex pyramidal cells. *J. Neurophysiol.* 72:644–658.

Beckstead RM (1979) An autoradiographic examination of corticocortical and subcortical projections of the mediodorsal-projection (prefrontal) cortex in the rat. *J Comp Neurol.* 184: 43-62

Bedwell SA, Billett EE, Crofts JJ, MacDonald DM, Tinsley CJ (2015) The topology of connections between rat prefrontal and temporal cortices. *Front Syst Neurosci.* 9:80, doi:10.3389/fnsys.2015.00080,

Bedwell SA, Billett EE, Crofts JJ, Tinsley CJ (2014) The topology of connections between rat prefrontal, motor and sensory cortices. *Front. Syst. Neurosci.*, 8:177.

Bennett C, Arroyo S, Berns D, Hestrin S (2012) Mechanisms generating dual-component nicotinic EPSCs in cortical interneurons. *J. Neurosci.* 32:17287–17296.

Benton AL (1991) The prefrontal region: Its early history. In H. S. Levin, H. M. Eisenberg, & A. L. Benton (Eds.), *Frontal lobe function and dysfunction*. New York: Oxford University Press. 3-32.

Berendse HW, Galis-de Graaf Y, Groenewegen HJ (1992) Topographical organization and relationship with ventral striatal compartments of prefrontal corticostriatal projections in the rat. *J Comp Neurol.* 316:314–47.

R. Bertorelli, G. Forloni, S. Consolo (1991) Modulation of cortical in vivo acetylcholine release by the basal nuclear complex: role of the pontomesencephalic tegmental area *Brain Res*, 563 pp. 353-356

Bloem B, Schoppink L, Rotaru DC, Faiz A, Hendriks P, Mansvelder HD, van De Berg WD, Wouterlood FG (2014a) Topographic mapping between basal forebrain cholinergic neurons and the medial prefrontal cortex in mice. *J. Neurosci.* 34:16234–16246.

Bloem B, Poorthuis RB, Mansvelder HD, (2014b) Cholinergic modulation of the medial prefrontal cortex: the role of nicotinic receptors in attention and regulation of neuronal activity. *Front Neural Circuits.* 11: 8-17. doi: 10.3389/fncir.2014.00017

Bohon KS, Wiest MC, (2014) Role of medio-dorsal frontal and posterior parietal neurons during auditory detection performance in rats. *PLoS One.* 9:e114064.

Boudewijns ZS, Groen MR, Lodder B, McMaster MT, Kalogreades L, De Haan R, Narayanan RT, Meredith RM, Mansvelder HD, De Kock CP. (2013) Layer-specific high-frequency action potential spiking in the prefrontal cortex of awake rats. *Front Cell Neurosci.* 7:99 doi:10.3389/fncel.2013.00099.

Brodman K (1909) Brodman's Localisation in the cerebral cortex. Translated by Laurence Garey. (2007) Third edition, Springer US.

Brown VJ, Bowman EM, (2002) Rodents models of prefrontal cortex function. *Trends neurosci.* 25: 340-343.

Brown D (2010) Muscarinic acetylcholine receptors (mAChR) in the nervous system: some functions and mechanisms. *J. Mol. Neurosci.* 41:340-346.

Bubser M, Byun N, Wood M, Jones C, (2012) "Muscarinic receptor pharmacology and circuitry for the modulation of cognition," in *Muscarinic Receptors*. Fryer AD, Christopoulos A, Nathanson NM (eds). 208:121–166.

Buzsaki G, Bickford RG, Ponomareff G, Yhal LJ, Mandel R, Gage FH, (1988) Nucleus basalis and thalamic control of neocortical activity in the freely moving rat *Neuroscience*, 8 pp. 4007–4026

Caballero A, Flores-Barrera E, Cass DK, Tseng KY (2014a) Differential regulation of parvalbumin and calretinin interneurons in the prefrontal cortex during adolescence. *Brain Struct Funct.* 219:395–406.

Carr DB, Sesack SR (1996) Hippocampal afferents to the rat prefrontal cortex: synaptic targets and relation to dopamine terminals. *J. Comp Neurol.* 369:1-15.

Carvell GE, Simons DJ (1990) Biometric analyses of vibrissal tactile discrimination in the rat. *J. Neurosci.* 10:2638-2648.

Cassaday HJ, Nelson AJ, Pezze MA (2014) From attention to memory along the dorsal-ventral axis of the medial prefrontal cortex: some methodological considerations. *Front Syst Neurosci.* 8:160.

Castejón C, Barros-Zulaica N, Nuñez A (2016) Control of somatosensory cortical processing by thalamic posterior medial nucleus: a new role of thalamus in cortical function. *PLoS One.* 11:1.

Castejon C, Nuñez A (2016) Cortical Neural Computation by Discrete Results Hypothesis. *Front Neural Circuits.* 10:81.

Castro-Alamancos MA (2002a) Properties of primary sensory (lemniscal) synapses in the ventrobasal thalamus and the relay of high-frequency sensory inputs. *J. Neurophysiol.* 87:946–953.

Castro-Alamancos MA (2002b) Role of thalamocortical sensory suppression during arousal: focusing sensory inputs in neocortex. *J. Neurosci.* 22:9651–9655.

Castro-Alamancos MA, (2004) Absence of rapid sensory adaptation in neocortex during information processing states. *Neuron.* 41:455–464.

- Cavdar S, Onat FY, Cakmak YO, Yananli HR, Gülçebi M, Aker R (2008) The pathways connecting the hippocampal formation, the thalamic reuniens nucleus and the thalamic reticular nucleus in the rat. *J Anat. Mar.* 212(3):249–256.
- Chandler DJ, Lamperski CS, Waterhouse BD (2013) Identification and distribution of projections from monoaminergic and cholinergic nuclei to functionally differentiated subregions of prefrontal cortex. *Brain Res.* 1522:38-58.
- Cheatwood JL, Reep RL, Corwin JV (2003) The associative striatum: cortical and thalamic projections to the dorsocentral striatum in rats. *Brain Res.* 968:1-14.
- Chudasama Y, Passetti F, Rhodes SE, Lopian D, Desai A, Robbins TW (2003) Dissociable aspects of performance on the 5-choice serial reaction time task following lesions of the dorsal anterior cingulate, infralimbic and orbitofrontal cortex in the rat: differential effects on selectivity, impulsivity and compulsivity. *Behav Brain Res.* 146:105–119.
- Chudasama Y, Dalley JW, Nathwani F, Bouger P, Robbins TW (2004) Cholinergic modulation of visual attention and working memory: dissociable effects of basal forebrain 192-IgG-saporin lesions and intraprefrontal infusions of scopolamine. *Learn Mem.* 11: 78-86.
- Chung S, Li X, Nelson SB (2002) Short-term depression at thalamocortical synapses contributes to rapid adaptation of cortical sensory responses in vivo. *Neuron.* 34:437–446.
- Clarke PB, Pert CB, Pert A, (1984) Autoradiographic distribution of nicotinic receptors in rat brain. *Brain Res.* 223:390-395.
- Cohen TE, Kaplan SW, Kandel ER, Hawkins RD (1997) A simplified preparation for relating cellular events to behavior: mechanisms contributing to habituation, dishabituation and sensitization of the Aplysia gill-withdrawal reflex. *J. Neurosci.* 17:2886-2899.
- Cole S, Mayer HS, Petrovic G (2015) Orexin/Hypocretin-1 Receptor Antagonism Selectively Reduces Cue-Induced Feeding in Sated Rats and Recruits Medial Prefrontal Cortex and Thalamus. *Scientific report.* 5:16143.
- Conde E, Maire-Lepoivre E, Audinat E, Crepel E (1995) Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. II. Cortical and subcortical afferents. *J. Comp. Neurol.* 352:567-593.
- Conde F, Audinat E, Maire-Lepoivre E, Crepel F (1990) Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. A study using retrograde transport of fluorescent dyes. I. Thalamic afferents. *Brain Res. Bull.* 24:341-354.
- Connors BW, Gutnick MJ, (1990) Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci.* 13:99-104.
- Cornwall J, Cooper JD, Phillipson OT (1990) Projections to the rostral reticular thalamic nucleus in the rat *Exp Brain Res.* 80:157-171,
- Couey JJ, Meredith RM, Spijker S, Poorthuis RB, Smit, AB, Brussaard, AB, Mansvelder HD, (2007) Distributed network actions by nicotine increase the

threshold for spike-timing-dependent plasticity in prefrontal cortex. *Neuron*. 54:73–87.

Courtin J, Chaudun F, Rozeske RR, Karalis N, Gonzalez-Campo C, Wurtz H, Abdi A, Baufreton J, Bienvenu TC, Herry C (2014) Prefrontal parvalbumin interneurons shape neuronal activity to drive fear expression. *Nature*. 505:92–96.

Dajas-Bailador F, Wonnacott S, (2004) Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol. Sci.* 25:317–324.

Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW, (2004) Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci Biobehav Rev*. 28:771-784.

De Felipe J, López-Cruz PL, Benavides-Piccione R, Bielza C, Larrañaga P, Anderson S, Burkhalter A, Cauli B, Fairén A, Feldmeyer D, Fishell G, Fitzpatrick D, Freund TF, González-Burgos G, Hestrin S, Hill S, Hof PR, Huang J, Jones EG, Kawaguchi Y, Kisvárdy Z, Kubota Y, Lewis DA, Marín O, Markram H, McBain CJ, Meyer HS, Monyer H, Nelson SB, Rockland K, Rossier J, Rubenstein JL, Rudy B, Scanziani M, Shepherd GM, Sherwood CC, Staiger JF, Tamás G, Thomson A, Wang Y, Yuste R, Ascoli GA. (2013) New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 14:202–216.

De Kock CP, Bruno RM, Spors H, Sakmann B (2007) Layer- and cell-type-specific suprathreshold stimulus representation in rat primary somatosensory cortex. *J Physiol*. 581:139-54.

De Kock CP, Sakmann B (2008) High frequency action potential bursts (> or =100 Hz) in L2/3 and L5B thick tufted neurons in anaesthetized and awake rat primary somatosensory cortex. *J. Physiol*. 586:3353–3364.

Dealy RS, Tolhurst DJ (1974) Is spatial adaptation an aftereffect of prolonged inhibition? *J. Physiol*. 241:261–270,

Dégenétais E, Thierry AM, Glowinski J, Gioanni Y (2002) Electrophysiological properties of pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex: an in vivo intracellular recording study. *Cereb Cortex*. 12(1):1-16.

De Kosky ST, Harburgh RE, Schmitt FA, Bakay RA, Chui HC, Knopmam DS, Reeder TM, Shetter AG, Senter HJ, Markesbery WR (1992) Cortical biopsy in Alzheimer's disease: diagnostic accuracy and neurochemical, neuropathological, and cognitive correlations. Intraventricular Bethanecol Study Group. *Ann. Neurol*. 32:625-632.

Delatour B, Gisquet-Verrier P (1996) Prelimbic cortex specific lesions disrupt delayed-variable response tasks in the rat. *Behav Neurosci*. 110:1282–1298.

Delatour B, Gisquet-Verrier P, (1999) Lesions of the prelimbic-infralimbic cortices in rats do not disrupt response selection processes but induce delay-dependent deficits: evidence for a role in working memory? *Behav Neurosci*, 113, pp. 941–955

Dembrow NC, Chitwood RA, Johnston D.(2010) Projection-specific neuromodulation of medial prefrontal cortex neurons. *J Neurosci*. 30:16922–16937

- Demeter E, Sarter M (2013) Leveraging the cortical cholinergic system to enhance attention. *Neuropharm*, 64:294-304.
- DeNardo LA, Berns DS, DeLoach K, Luo L (2015) Connectivity of mouse somatosensory and prefrontal cortex examined with trans-synaptic tracing. *Nat Neurosci*. 18:1687–1697.
- Deschênes M, Timofeeva E, Lavallée P (2003) The relay of highfrequency sensory signals in the Whisker-to-barreloid pathway. *J. Neurosci*. 30:6778-6787.
- Deschenes, M., Timofeeva, E., Lavallee, P., 2003. The relay of highfrequency sensory signals in the whisker-to-Barreloid pathway. *J. Neurosci*. 23, 6778–6787
- Deutch AY (1993) Prefrontal cortical dopamine systems and the elaboration of functional corticostriatal circuits: implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *J Neural Transm Gen Sect*. 91:197–221,
- Diamond ME, Armstrong-James M, Ebner FF (1992) Somatic sensory responses in the rostral sector of the posterior group (POm) and in the ventral posterior medial nucleus of the rat thalamus. *J. Comp. Neurol*. 318:462–476.
- Diaz-Quesada M, Maravall M (2008). Intrinsic mechanisms for adaptive gain rescaling in barrel cortex. *J. Neurosci*. 28:696–710,
- Ding DCD, Gabbott PLA, Totterdell S (2001) Differences in the laminar origin of projections from the medial prefrontal cortex to the nucleus accumbens shell and core regions in the rat. *Brain Res*. 917:81–9.
- Divac I, Mogensen J, Petrovic-Minic B, Zilles K, Regidor J (1993) Cortical projections of the thalamic mediodorsal nucleus in the rat. Definition of the prefrontal cortex. *Acta Neurobiol Exp* 53:425-29.
- Divac I, Mogenson J (1985) The prefrontal cortex in the pigeon. Catecholamine histofluorescence. *Neurosci*. 15:677–82.
- Douglas RJ, Martin KA (2004) Neuronal circuits of the neocortex. *Annu Rev Neurosci*. 27:419–451,
- Dragoi V, Sharma J, Miller EK, Sur M (2002) Dynamics of neuronal sensitivity in visual cortex and local feature discrimination. *Nat. Neurosci*. 5:883–891,
- Du X, Jansen (2011) A neural network model of normal and abnormal auditory information processing. *Neural networks*. 24: 568-574.
- Duque A, Balatoni B, Detari L, Zaborszky L (2000) EEG correlation of the discharge properties of identified neurons in the basal forebrain. *J. Neurophysiol*. 84:1627–1635.
- Erchova IA, Lebedev MA, Diamond ME, (2002) Somatosensory cortical neuronal population activity across states of anaesthesia. *Eur J neurosci*. 15:744-52.
- Erzurumlu RS (2010) Critical period for the whisker-barrel system. *Exp. Neurol*. 222:10–12.

- Fanselow EE, Sameshima K, Baccala LA, Nicoletis MAL (2001) Thalamic bursting in rats during different awake behavioral states. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:15330–15335.
- Feldmeyer D, (2012) Excitatory neuronal connectivity in the barrel cortex. *Front Neuroanat.* 6:24. doi:0,3389/fnana.2012.00024
- Fisk GD, Wyss JM (2000) Descending projections of infralimbic cortex that mediate stimulation-evoked changes in arterial pressure. *Brain Res* 859: 83-95.
- Floyd NS, Price JL, Ferry AT, Keay KA, Bandler R (2000) Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. *J Comp Neurol.* 422:556–78.
- Floyd NS, Price JL, Ferry AT, Keay KA, Bandler R (2001) Orbitomedial prefrontal cortical projections to hypothalamus in the rat. *J Comp Neurol.* 432:307–28.
- Fox K, (2002) Anatomical pathways and molecular mechanisms for plasticity in the barrel cortex. *Neurosci.* 111:799-814.
- Freedman LK, Caseel MD (1991) Thalamic afferents of the rat infralimbic and lateral agranular cortices. *Brain Res Bull.* 26:957-964.
- Fryszak RJ, Neafsey EJ (1994) The effect of medial frontal cortex lesions on cardiovascular conditioned emotional responses in the rat *Brain Res.* 643:181–193
- Fucile S. (2004) Ca²⁺ permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium.* 35:1–8.
- Fuster J (2008) The prefrontal cortex. Elsevier, 5th Edition.
- Gabbott PL, Dickie BG, Vaid RR, Headlam AJ, Bacon SJ (1997) Local-Circuit neurons in the medial prefrontal cortex (areas 25, 32, y 24b) in the rat: morphology and quantitative distribution. *J. Comp neurol.* 377:465-499.
- Gabbott PL, Warner TA, Jays PR, Salway P, Busby SJ (2005) Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol.* 492:145-77.
- Gabernet L, Jadhav SP, Feldman DE, Carandini M, Scanziani M (2005) Somatosensory integration controlled by dynamic thalamocortical feed-forward inhibition. *Neuron.* 48:315–327.
- Ganmor E, Katz Y, Lampl I (2010) Intensity-dependent adaptation of cortical and thalamic neurons is controlled by brainstem circuits of the sensory pathway. *Neuron.* 66:273–286.
- Gaykema RPA, Van Weeghel B, Hersh LB, Luiten PGM (1991) Prefrontal cortical projections to the cholinergic neurons in the basal forebrain. *J Comp Neurol.* 303:563–83.
- Geneser-Jensen FA, Blackstad TW (1971) Distribution of acetyl cholinesterase in the hippocampal region of the guinea pig. I. Entorhinal area, parasubiculum, and presubiculum. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 114:460-81,

- Gill TM, Sarter M, Givens B (2000) Sustained visual attention performance-associated prefrontal neuronal activity: evidence for cholinergic: evidence for cholinergic modulation. *J. Neurosci.* 20:4745-4757.
- Gioanni Y, Rougeot C, Clarke P, Lepouse C, Thierry AM, Vidal C (1999) Nicotinic receptors in the rat prefrontal cortex: increase in glutamate release and facilitation of mediodorsal thalamo-cortical transmission. *Eur. J. Neurosci.* 11: 18–30,
- Goard M, Dan Y, (2009) Basal forebrain activation enhances cortical coding of natural scenes. *Nat. Neurosci.* 12:1444–1449
- Golmayo L, Nuñez A, Zaborsky L (2003) Electrophysiological evidence for the existence of a posterior cortical-prefrontal-basal forebrain circuitry in modulating sensory responses in visual and somatosensory rat cortical areas. *Neurosciencie.* 119:597-609.
- Gotti C, Clementi F (2004). Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog. Neurobiol.* 74: 363–396.
- Gotti C, Zoli M, Clementi F, (2006). Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 482-491
- Gretenkord S, Rees A, Whittington MA, Gartside SE, LeBeau FEN (2017) Dorsal vs ventral differences in fast Up-state associated oscillations in the medial prefrontal cortex of the urethane-anesthetized rat. *J Neurophysiol.* 117:1126-1142.
- Griguoli M, Cellot G, Cherubini E (2013) In hippocampal oriens interneurons anti-Hebbian long-term potentiation requires cholinergic signaling via $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurosci.* 33:1044–1049.
- Groenewegen HJ (1988) Organization of the afferent connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to mediodorsal–prefrontal topography. *Neurosci.* 24:379–431
- Groenewegen HJ, HW Berendse, JG Wolters and AH Lohman (1990) The anatomical relationship of the prefrontal cortex with the striatopallidal system, the thalamus and the amygdala: evidence for a parallel organization. *Prog. Brain Res.* 85: 95-116
- Groenewegen HJ, Uylings HB (2000) The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. *Prog Brain Res.* 126:328.
- Gulledge AT, Park SB, Kawaguchi Y, Stuart GJ (2007) Heterogeneity of phasic cholinergic signaling in neocortical neurons. *J. Neurophysiol.* 97:2215–2229.
- Gulledge AT, Bucci DJ, ZhangSS, Matsui M, Yeh HH, (2009) M1 receptors mediate cholinergic modulation of excitability in neocortical pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 29: 9888–9902
- Hahn, B, Shoaib, M, and Stolerman, IP, (2003c) Involvement of the prefrontal cortex but not the dorsal hippocampus in the attention-enhancing effects of nicotine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 168: 271–279.

- Hajos M, Richards CD, Szekely AD, Sharp T (1988) An electrophysiological and neuroanatomical study of the medial prefrontal cortical projection to the midbrain raphe nuclei in the rat. *Neurosci.* 87:95–108.
- K. Hara, R.A. Harris (2002) The anesthetic mechanism of urethane: the effects on neurotransmitter-gated ion channels *Anesth Analg*, 94: 313-318
- Hartings JA, Temereanca S, Simons DJ (2003) State-dependent processing of sensory stimuli by thalamic reticular neurons. *J. Neurosci.* 23:5264–5271,
- Hasselmo ME, Giocomo, LM. (2006) The cholinergic modulation of cortical function. *J. Mol. Neurosci.* 30:133–135.
- Hasselmo ME, Sarter M (2011) Modes and models of forebrain cholinergic neuromodulation of cognition. *Neuropsychopharmacol.* 36:52–73.
- Hefft S, Jonas P (2005) Asynchronous GABA release generates longlasting inhibition at a hippocampal interneuron-principal neuron synapse. *Nat Neurosci.* 8:1319–1328.
- Heidbreder C, Thompson A, Shippenberg TS, (1996) Role of extracellular dopamine in the initiation and long-term expression of behavioral sensitization to cocaine. *J Pharmacol Exp Ther*, 278: 490–502
- Heidbreder CA, Groenewegen HJ (2003) The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27:555-579.
- Heiss JE, Katz Y, Ganmor E, Lampl I, (2008) Shift in the balance between excitation and inhibition during sensory adaptation of S1 neurons. *J. Neurosci.* 28:13320-13330
- Herzog CD, Nowak KA, Sarter M, Bruno JP, (2003) Microdialysis without acetylcholinesterase inhibition reveals an age-related attenuation in stimulated cortical acetylcholine release. *Neurobiol. Aging*, 24:861–863.
- Higley MJ, Contreras D (2006) Balanced excitation and inhibition determine spike timing during frequency adaptation. *J. Neurosci.* 26:448–457.
- Hioki H, Okamoto S, Konno M, Kameda H, Sohn J, Kuramoto E, Fujiyama F, Kaneko T (2013) Cell type-specific inhibitory inputs to dendritic and somatic compartments of parvalbumin-expressing neocortical interneuron. *J. Neurosci.* 33:544–555. doi:10.1523/JNEUROSCI. 2255-12.
- Hodges JR, Patterson K (1995) Is semantic memory consistently impaired early in the course of Alzheimer disease? Neuroanatomical and diagnostic implications. *Neuropsychologia.* 33:441-459.
- Hoover WB, Vertes RP (2007) Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct Funct.* 212(2):149-79.
- Houser CR, Crawford GD, Salvaterra PM, Vaughn JE (1985) Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase in rat cerebral cortex: a study of cholinergic neurons and synapses. *J. Comp Neurol.* 234:17-34.

- Howe WM, Berry AS, Francois J, Gilmour G, Carp JM, Tricklebank M, Lustig C, Sarter M, (2013) Prefrontal cholinergic mechanisms instigating shifts from monitoring for cues to cue-guided performance: converging electrochemical and fMRI evidence from rats and humans. *J Neurosci.* 33: 8742-52.
- Hua Hu, Jian Gan, Peter Jonas (2014) Fast-spiking, parvalbumin+ GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function. *Science.* 345: 6196.
- Hurley K, Herbert H, Moga MM, Saper CB (1991) Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *J Comp Neurol.* 308:249–76.
- Imada A, Morris A, Wiest MC (2013) Deviance detection by a P3-like response in rat posterior parietal cortex. *Front Integr Neurosci.* 6:1
- Jacob V, Le Cam J, Ego-Stengel V, Shulz DE, (2008) Emergent properties of tactile scenes selectively activate barrel cortex neurons. *Neuron,* 60: 1112-1125
- Jasper HH, Tesser J (1971) Acetylcholine liberation from cerebral cortex during paradoxical (REM) sleep. *Science.* 172:601-602.
- Jodo E, Aston-Jones G (1997) Activation of locus coeruleus by prefrontal cortex is mediated by excitatory amino acid inputs. *Behav Brain Res.* 768:327–32.
- Jodo E, Cahng C, Aston-Jones G (1998) Potent excitatory influence of prefrontal cortex activity on noradrenergic locus coeruleus neurons. *Neurosci.* 83:63–79.
- Johansen JP, Fields HL, Manning BH (2001) The Affective component of pain in rodents: direct evidence for a contribution of the anterior cingulate cortex. *Proc Natl Acad Sci.* 98:8077-8082.
- Johnson LA, Euston DR, Tatsuno M, McNaughton BL (2010). Stored-trace reactivation in rat prefrontal cortex is correlated with down-to-up state fluctuation density. *J Neurosci* 30:2650 –2661,
- Jones EG (2007) *The thalamus.* Cambridge University Press, New York.
- Kassam SM, Herman PM, Goodfellow NM, Alves NC, Lambe EK (2008) Developmental excitation of corticothalamic neurons by nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurosci.* 28:8756–8764.
- Katz Y, Heiss JE, Lampl I (2006) Cross-whisker adaptation of neurons in the rat barrel cortex. *J. Neurosci.* 26:13363–13372.
- Kesner RP, John A, Churchwell C (2011) An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function. *Neurobiology of Learning and Memory.* 96:417–431,
- Khatri V, Hartings JA, Simons DJ (2004) Adaptation in thalamic barreloid and cortical barrel neurons to periodic Whisker deflections varying in frequency and velocity. *J. Neurophysiol.* 92:3244–3254.
- Kim D, Jeong H, Lee J, Ghim, JW, Her, ES, Lee SH Jung MW (2016) Distinct Roles of Parvalbumin and Somatostatin-Expressing Interneurons in Working Memory. *Neuron.* 92:902-915.

- Kim H, Ahrlund-Richter S, Wang X, Deisseroth K, Carlén M (2016) Prefrontal parvalbumin neurons in control of attention. *Cell*. 164:208-216.
- Klausberger T, Somogyi P, (2008) Neuronal diversity and temporal dynamics: The unity of hippocampal circuit operations. *Science*. 321:53–57. doi: 10.1126/science.1149381; pmid: 18599766.
- Koralek KA, Jensen KF, Killackey HP (1988) Evidence for two complementary patterns of thalamic input to the rat somatosensory cortex. *Brain Res*. 463:346-351,
- Krettek JE, Price JL (1977) The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. *J Comp Neurol*. 171:157–191,
- Krnjevic K (2004) Synaptic mechanisms modulated by acetylcholine in cerebral cortex. *Prog. Brain Res*. 145:81–93.
- Krout KE, Belzer RE, Loewy AD (2002) Brainstem projection to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *J Comp Neurol*. 448:53-101,
- Kuo MC, Rasmusson DD, Dringenberg HC (2009) Input selective potentiation and rebalancing of primary sensory cortex afferents by endogenous acetylcholine. *Neurosci*. 163:430–441,
- Kvitsiani D, Ranade S, Hangya B, Taniguchi H, Huang JZ, Kepecs A (2013) Distinct behavioural and network correlates of two interneuron types in prefrontal cortex. *Nature*. 498:363–366. doi:10.1038/nature12176.
- Lambe EK, Picciotto MR, Aghajanian GK (2003) Nicotine induces glutamate release from thalamocortical terminals in prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*. 28:216–225.
- Laplanche F, Morin Y, Quiron R, Vaucher E (2005) Acetylcholine release is elicited in the visual cortex, but not in the prefrontal cortex by patterned visual stimulation: a dual in vivo microdialysis study with functional correlates in the rat brain. *Neurosci*. 132:501-510,
- Ledoux JE, Ruggiero DA, Forest R, Stornetta R, Reis DJ (1987) Topographic organization of convergent projections to the thalamus from the inferior colliculus and spinal cord in the rat. *J. Comp Neurol*. 264:123–146.
- Lee CJ, Withsel BL (1992) Mechanisms underlying somatosensory cortical dynamics: I. In vivo studies. *Cereb. Cortex*. 2:81-106.
- Lee KJ, Woolsey TA (1975) A proportional relationship between peripheral innervation density and cortical neuron number in the somatosensory system of the mouse. *Brain Res*. 99:349–353.
- Lehericy J, Hirsch EC, Cervera-Pierot P, Hersch LB, Bakchine S, Piette F, Duyckaerts C, Hauw JJ, Javoy-Agid F, Agid Y (1993) Heterogeneity and selectivity of the degeneration of cholinergic neurons in the basal forebrain of patients with Alzheimer's disease. *J. Comp Neurol*. 330:15-31,
- Leonard CM (1972) The connections of the dorsomedial nuclei. *Brain Behav Evol*. 6:524–41,

- Levin ED, Limpuangthip J, Rachakonda T, Peterson M (2006a) Timing of nicotine effects on learning in zebrafish. *Psychopharmacology*. 184:547–552.
- Levin ED, McClernon FJ, Rezvani AH, (2006b) Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. *Psychopharmacology*. 184:523–539.
- Little JP, Carter AG, (2013) Synaptic mechanisms underlying strong reciprocal connectivity between the medial prefrontal cortex and basolateral amygdala. *J. Neurosci*. 33:15333–15342. doi:10.1523/JNEUROSCI.2385-13.
- Lu Y, Simpson KL, Weaver KJ, Lin RC (2012) Differential distribution patterns from medial prefrontal cortex and dorsal raphe to the locus coeruleus in rats. *Anat. Rec*. 295(7):1192-201,
- Manns ID, Sakmann B, Brecht M (2004) Sub-and suprathreshold receptive field properties of pyramidal neurons in layers 5A and 5B of rat somatosensory barrel cortex, *J. Physiol. Lond*. 15:601-622.
- Mansvelder HD, McGehee DS (2000) Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron*. 27:349–357.
- Maravall M, Alenda A, Bale MR, Petersen RS (2013) Transformation of adaptation and gain rescaling along the whisker sensory pathway. *PloS One*. 8, e82418.
- Maravall M, Petersen RS, Fairhall AL, Arabzadeh E, Diamond ME (2007) Shifts in coding properties and maintenance of information transmission during adaptation in barrel cortex. *PLoS Biol*. 5, e19.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C, (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system *Nat. Rev. Neurosci.*, 5 (2004), pp. 793–807
- Maurice N, Deniau JM, Glowinski J, THiery AM (1998) Relationship between the prefrontal cortex and the basal ganglia in the rat physiology of the cortico-subthalamic pathways. *J Neurosci*. 18:9539-9546.
- R. Metherate, C.L. Cox, J.H. Ashe (1992) Cellular bases of neocortical activation–modulation of neural oscillations by the nucleus basalis and endogenous acetylcholine. *J. Neurosci.*, 12 : 4701–4711
- McCormick DA, Connors BW, Lighthall JW, Prince DA (1985) Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *J. Neurophysiol*. 54:782-806.
- McCormick DA, (1992) Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex and their role in neuromodulation of thalamocortical. *Prog. Neurobiol*. 39:364-370,
- Melzer P, Sachdev RN, Jenkinson N, Ebner FF (2006) Stimulus frequency processing in awake rat barrel cortex. *J. Neurosci*. 22:12198-12205.
- Mosconi T, Woolsey TA, Jacquin MF (2010) Passive vs. active touch induced activity in the development whisker pathway. *Eur.J. Neuroscience*. 32:1354–1363.

- Nelson SB (1991) Pharmacological studies of cortical suppression suggest a presynaptic mechanism. *J. Neurosci.* 11:369–380,
- Nissl F (1913) [Die Grosshirnanteile des Kaninchens]. *Arch Psychiat Nerven*, 52: 867–953.
- Northcutt RG, Kaas JH (1995) The emergence and evolution of mammalian neocortex. *Trends Neurosci.* 18:373–9.
- Nuñez A, García-Austt E, Buño W, (1990) Slow intrinsic spikes recorded in vivo in rat CA1-CA3 hippocampal pyramidal neurons. *Exp Neurol.* 109:294-9
- Nuñez A, (1996) Unit activity of rat basal forebrain neurons: relationship to cortical activity. *Neurosci.* 72:757–766.
- Nuñez A, Amzica F, Steriade M (1993) Electrophysiology of cat association cortical cells in vivo: intrinsic properties and synaptic responses. *J. Neurophysiol.* 70(1):418-30,
- Nuñez A, Dominguez S, Washington B (2012) Cholinergic-mediated response enhancement in barrel cortex layer V pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* 108:1656–1668.
- Ongur D, JL Price (2000) The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cereb. Cortex.* 10:206-219.
- Paolone G, Lee TM, Sarter M, (2012) Time to pay attention: attentional performance time-stamped prefrontal cholinergic activation, diurnality, and performance. *J Neurosci* 32:12115-12128.
- Pandya DN, Yeterian EH (1990) Prefrontal cortex in relation to other cortical areas in the rhesus monkey: architecture and connections. *Prog Brain Res.* 85:63–94.
- Panetsos F, Nuñez A, Avendaño C (1995) Local anaesthesia induces immediate receptive field changes in nucleus gracilis and cortex. *Neuroreport.* 7:150-152.
- Parikh V, Kozak R, Martinez V Sarter M (2007) Prefrontal acetylcholine release controls cue detection on multiple timescales. *Neuron.* 56:141-154.
- Parikh V, Sarter M. (2008) Cholinergic mediation of attention: contributions of phasic and tonic increases in prefrontal cholinergic activity. *Ann N Y Acad* 1129:225-235
- Paxinos G, Watson C (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th Ed. Academic Press, San Diego.
- Perkel DH, Gerstein GL, Moore GP (1967) Neuronal Spike Trains and stochastic point process. *Biophysical Journal.* 7:391-418.
- Pezze M, McGarrity S, Mason R, Fone KC, Bast T (2014) Too little and too much: hypoactivation and disinhibition of medial prefrontal cortex cause attentional deficits. *J Neurosci.* 34:7931–7946.

Pfeffer CK, Xue M, He Z, Huang J, Scanziani M (2013) Inhibition of inhibition in visual cortex: The logic of connections between molecularly distinct interneurons. *Nat. Neurosci.* 16:1068–1076.

Picciotto MR, Higley MJ, Mineur YS, (2012). Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron* 76: 116–129.

Pierce RC, Reeder DC, Hicks J, Morgan ZR, Kalivas PW (1998) Ibotenic acid lesion of the dorsal prefrontal cortex disrupt the expression of behavioral sensitization to cocaine. *Neurosci.* 82:1103-1114.

Pierret T, Lavallée P, Deschênes M, (2000) Parallel streams for the relay of vibrissal information through thalamic barreloids. *J. Neurosci.* 20:7455–7462.

Poorthuis RB, Bloem B, Verhoog MB, Mansvelder HD (2013a) Layer-specific interference with cholinergic signaling in the prefrontal cortex by smoking concentrations of nicotine. *J. Neurosci.* 33:4843–4853.

Poorthuis RB, Bloem B, Schak B, Wester J, De Kock CP, Mansvelder HD (2013b) Layer-specific modulation of the prefrontal cortex by nicotinic acetylcholine receptors. *Cereb Cortex.* 23:148-61,

Pouchelon G, Frangeul L, Rijli FM, Jabaudon D (2012) Patterning of pre-thalamic somatosensory pathways. *J. Neurosci.* 35:1533-1539.

Preuss TM (1995a) Do rats have a prefrontal cortex? The Rose–Woolsey– Akert program reconsidered. *J Cogn Neurosci.* 7:1–24.

Preuss TM (1995b) The argument from animals to humans in cognitive neuroscience. In M. S. Gazzaniga (Ed.), *The cognitive neurosciences*, Cambridge, MIT Press. 1127-1241,

Preuss TM, Goldman-Rakic PS J (1991) Ipsilateral cortical connections of granular frontal cortex in the strepsirrhine primate Galago, with comparative comments on anthropoid primates. *J Comp Neurol.* 1991 ;310: 507-49.

Ragozzino ME, Adamas S, Kesner RP (1998) Differential involvement of the dorsal anterior cingulate cortex and prelimbic-infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in spatial working memory. *Behav Neurosci.* 112:293-303.

Ragozzino ME Wilcox C, Raso M, Kesner RP (1999a) Involvement of rodent prefrontal cortex subregions in strategy switching. *Behav Neurosci.* 113:32-41,

Ragozzino ME, Detrick S, Kesner RP (1999b) Involvement of the prelimbic-Infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in behavioral flexibility for place and response learning. *J. Neurosci.* 19:4585-4594.

Rasmusson DD, Smith SA, Semba K (2007) Inactivation of prefrontal cortex abolishes cortical acetylcholine release evoked by sensory or sensory pathway stimulation in the rat. *Neuroscience.* 149: 232-241,

Reep RL, Goodwin GS, Corwin JV (1990) Topographic organization in the corticocortical connections of medial agranular cortex in rats. *J Comp Neurol.* 294:262–80,

- Reep RL, Winans SS (1982) Afferent connections of dorsal and ventral agranular insular cortex in the hamster, *Misocricetus auratus*. *Neurosci.* 7:1265–88.
- Riga D, Matos M, Glas A, Smit A, Spijker S, Van der Oever MC (2014) Optogenetic dissection of medial prefrontal cortex circuitry. *Front Syst Neurosci.* doi.org/10.3389/fnsys.2014.00230,
- Room P, Russchen FT, Groenewegen HJ, Lohman AH (1985) Efferent connections of the prelimbic (area 32) and the infralimbic (area 25) cortices: an anterograde tracing study in the cat. *J Comp.* 242:40-55.
- Rose JE, Woolsey CL (1948a) Structure and relations of limbic cortex and anterior thalamic nuclei in rabbit and cat. *Journal of Comparative Neurology.* 89:279-340,
- Rose JE, Woolsey CN (1948b) The orbitofrontal cortex and its connections with the mediodorsal nucleus in rabbit, sheep and cat. *Research Publications Association for Research in Nervous and Mental Disease.* 27:210-232.
- Rossi MA, Hayrapetyan VY, Maimon B, Mak K, Je HS, Yin HH, (2012) Prefrontal cortical mechanisms underlying delayed alternation in mice. *J. Neurophysiol.* 108:1211–1222.
- Rotaru DC, Barrionuevo G, Sesack SR (2005) Mediodorsal thalamic afferents to layer III of the rat prefrontal cortex: synaptic relationships to subclasses of interneurons. *J. Comp Neurol.* 490:220-38.
- Rubio-Garrido P, Perez de Manzo F, Porrero C, Galazo Mj, Clasca F (2009) Thalamic input to apical dendrites in neocortical layer 1 is massive and highly convergent. *Cereb. Cortex.* 19:2380-2395.
- Ruiz-Mejias M, Ciria-Suarez L, Mattia M, Sanchez-Vives MV (2011) Slow and fast rhythms generated in the cerebral cortex of the anesthetized mouse. *J Neurophysiol.* 106: 2910–2921, 2011.
- Sanchez-Vives MV, McCormick DA, (2000) Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat. Neurosci.*, 3 (2000), pp. 1027–1034
- Saper CB (1985) Organization of cerebral cortical afferent system in the rat. II. Hypothalamic projections. *J Comp Neurol.* 237:28-46.
- Sarter M, Givens B, Bruno JP (2001) The cognitive neuroscience of sustained attention: where top-down meets bottom-up. *Brain Res Rev.* 35:146-160,
- Sarter M, Lustig C, Howe WM, Gritton H, Berry AS (2014) Deterministic functions of cortical acetylcholine. *Eur. J. Neurosci.* 39:1912–1920,
- Sarter M, Markowitsch HJ, (1984) Collateral innervation of the medial and lateral prefrontal cortex by amygdaloid, thalamic, and brain-stem neurons. *J Comp Neurol.* 224:445–60,
- Sarter M, Markowitsch HJ, (1983) Convergence of basolateral amygdaloid and mediodorsal thalamic projections in different areas of the frontal cortex in the rat. *Brain Res Bull.* 10:607–22.

- Sarter M, Hasselmo ME, Bruno JP, Givens B (2005) Unraveling the attentional functions of cortical cholinergic inputs: interactions between signal-driven and cognitive modulation of signal detection. *Brain Res Rev.* 48:98-111,
- Sarter M¹, Paolone G, (2011) Deficits in attentional control: cholinergic mechanisms and circuitry-based treatment approaches. *Behav Neurosci.* 125: 825-35
- Satoh K, Fibiger HC (1986) Cholinergic neurons of the laterodorsal tegmental nucleus: efferent and afferent connections. *J Comp Neurol.* 1986 253: 277-302.
- Saunders A, Granger AJ, Sabatini BL (2015) Corelease of acetylcholine and GABA from cholinergic forebrain neurons *Elife.* doi: 10,7554/ eLife.06412.
- Seamans JK, Lapish CC, Durstewitz D (2008) Comparing the prefrontal cortex of rats and primates: insights from electrophysiology. *Neurotox Res.* 14:249–262.
- Schmued LC, Fallon JH (1986) FLuoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res* 377:147-154.
- Semba K, Fibiger HC (1992) Afferent connections of the laterodorsal and the pedunculo pontine tegmental nuclei in the rat: a retro- and anterograde transport and immunohistochemical study. *J Comp Neurol.* 323:387–410,
- Sesack SR, Deutch AY, Roth RH, Bunney BS (1989) Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study using *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. *J Comp Neurol.* 290:213–42
- Sharpee TO, Sugihara H, Kurgansky AV, Rebrik SP, Stryker MP, Miller KD (2006) Adaptive filtering enhances information transmission in visual cortex. *Nature.* 439:936–942.
- Sherman SM, Guillery RW, (1998) On the actions that one nerve cell can have on another: distinguishing "drivers" from "modulators". *Proc Natl Acad Sci.* 95(12):7121-6.
- Simons DJ, Carvell GE, Hershey AE, Bryant DP, (1992) Responses of barrel cortex neurons in awake rats and effects of urethane anesthesia. *Exp. Brain Res.* 91:259–272.
- Sohal VS, (2012) Insights into cortical oscillations arising from optogenetic studies. *Biol Psychiatry.* 71:1039–1045.
- Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, Deisseroth K, (2009) Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance *Nature.* 459: 698–702.
- Soma S, Shimegi S, Osaki H Sato H, (2012) Cholinergic modulation of response gain in the primary visual cortex of the macaque. *J. Neurophysiol.* 107:283-291,
- Spruston N (2008) Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat Rev Neurosci.* 9:206–221,

- Steriade M, Nuñez A, Amzica F (1993) A novel slow (<1 Hz) oscillation of neocortical neurons in vivo: depolarizing and hyperpolarizing components. *J Neurosci* 13: 3252–3265,
- Tabares RF, Correa A, (2006) Role of the medial prefrontal cortex in cardiovascular responses to acute restraint in rats. *Neurosci.* 143:231-240
- Thierry AM, Blanc G, Sobel A, Stinus L, Glowinski J (1973) Dopaminergic terminals in the rat cortex. *Science.* 182:499–501.
- Thomson AM, Bannister AP, (2003) Interlaminar connections in the neocortex.. *Cereb Cortex.* 2003 13:5-14.
- Toledo-Rodriguez M, Blumenfeld B, Wu C, Luo J, Attali B, Goodman P, Markram H (2004) Correlation maps allow neuronal electrical properties to be predicted from single-cell gene expression profiles in rat neocortex. *Cereb Cortex.* 14:1310–1327.
- Torres-García ME, Solis O, Patricio A, Rodríguez-Moreno A, Camacho-Abrego I, Limón ID, Flores G (2012) Dendritic morphology changes in neurons from the prefrontal cortex, hippocampus and nucleus accumbens in rats after lesion of the thalamic reticular nucleus. *Neurosci.* 223:429-438.
- Tukker JJ, Lasztóczy B, Katona L, Roberts JD, Pissadaki EK, Dalezios Y, Márton L, Zhang L, Klausberger T, Somogyi P (2013) Distinct dendritic arborization and in vivo firing patterns of parvalbumin-expressing basket cells in the hippocampal area CA3. *J. Neurosci.* 33:6809–6825 doi:10.1523/JNEUROSCI.5052-12.
- Ulanovsky N, Las L, Nelken I (2003) Processing of lowprobability sounds by cortical neurons. *Nat. Neurosci.* 6:391–398.
- Urbain N, Deschênes M (2007) A new thalamic pathway of vibrissal information modulated by the motor cortex. *J. Neurosci.* 27:12407-12412.
- Uylings HB, CG van Eden (1990) Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. *Prog Brain Res.* 85:31-62.
- Uylings HB, Groenewegen HJ, Bryan Kolb B (2003) Review Do rats have a prefrontal cortex? *Bhav Brain Res.* 146:3–17.
- Uylings HB, Groenewegen HJ, Kolb B (2003) Do rats have a prefrontal cortex? *Behav Brain Res.* 146:3–17.
- Uylings HB, Van Eden CG, De Bruin JPC, Corner MA, Feenstra MPG, (1990) The prefrontal cortex: its structure, function and pathology. *Progress in brain research*, vol. 85. 31–62.
- Van Aerde KL, Feldmeyer D (2015) Morphological and Physiological Characterization of Pyramidal Neuron Subtypes in Rat Medial Prefrontal Cortex *Cereb Cortex.* 25:788-805.
- Van der Loos, H (1976) Barreloids in mouse somatosensory thalamus. *Neurosci lett.* 2:1-6.

Van Eden CG, Buijs RM (2000) Functional neuroanatomy of the prefrontal cortex: autonomic interactions. In: Uylings HBM, van Eden CG, de Bruin JPC, Feenstra MPG, Pennartz CMA, editors. Cognition, emotion, and Autonomic responses. The integrative role of the prefrontal cortex and limbic structures. Progress in Brain Research. 126:49–62.

Van Eden CG, Lamme VAF, Uylings HBM (1992) Heterotopic cortical afferents to the medial prefrontal cortex in the rat. A combined retrograde and anterograde tracer study. Eur J Neurosci. 4:77–97.

Van Eden CG, Uylings HBM (1985) Cytoarchitectonic development of the prefrontal cortex in the rat. J Comp Neurol, 241:253–67.

Verhoog MB, Obermayer J, Kortleven CA, Wilbers R, Wester J, Baayen JC, De Kock CPJ, Meredith RM, Mansvelder HD (2016) Layer-specific cholinergic control of human mouse cortical synaptic plasticity. Nat. Commun. 7: 12826.

Vertes RP (2002) Analysis of projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on nucleus reuniens. J. comp. neurol. 442:163-187

Vertes RP, (2004) Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. Synapse 51, 32–58.

Vertes RP, (2006) Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. Neurosci. 142: 1–20,

Vikaas S Sohal, Feng Zhang, Ofer Yizhar, Karl Deisseroth (2009) Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. Nature. 459:698-702.

Vogt BA, Paxinos G (2014) Cytoarchitecture of mouse and rat cingulate cortex with human homologies. Brain Struct Funct. 219:185-92.

Von der Behrens W, Bauerle P, Kossel M, Gaese BH (2009) Correlating stimulus-specific adaptation of cortical neurons and local field potentials in the awake rat. J. Neurosci. 29:13837–13849.

Wallace TL, Bertrand D (2013) Importance of the nicotinic acetylcholine receptor system in the prefrontal cortex. Biochem Pharmacol. 85:1713-20,

Wang Y, Markram H, Goodman PH, Berger TK, Ma J, Goldman-Rakic, PS (2006) Heterogeneity in the pyramidal network of the medial prefrontal cortex. Nat. Neurosci. 9:534–542. doi:10.1038/nn1670,

Westbrook G (2013) “Seizures and epilepsy,” in Principles of Neural Science, E. Kandel, J. H. Schwartz, T. M. Jessell, S. Siegelbaum, A. J. Hudspeth, Eds. (McGraw-Hill, New York, 2013), 1116–1139.

Williams SM, PS Goldman-Rakic (1998) Widespread origin of the primate mesofrontal dopamine system. Cereb. Cortex. 8:321-345.

Wimmer RD, Schmitt L, Nakajima M, Deisseroth K, Halassa MM (2015) Thalamic control of Sensory selection in divided attention. Nature. 526:705-709.

Wise SP. 2008. Forward frontal fields: phylogeny and fundamental function. *Trends Neurosci* 31:599-608.

Zaborsky L, Gaykema RP, Swanson DJ, Cullinan WE (1997) Cortical input to the basal forebrain. *Neuroscience*. 79:1051-1078.

Zaborsky L, Pang K, Somogyi J, Nadasdy Z, Kallo I (1999) The basal forebrain corticopetal system revisited. *Ann NY Acad Sci*. 877:339-367.

Zaborszky L, Csordas A, Mosca K, Kim J, Gielow MR, Vadasz C, Nadasdy Z (2015) Neurons in the basal forebrain project to the cortex in a complex topographic organization that reflects corticocortical connectivity patterns: an experimental study based on retrograde tracing and 3D reconstruction. *Cereb Cortex*. 25:118–137.

Zaitsev AV, Povysheva NV, Lewis DA, Krimer LS (2007) P/Q-type, but not N-type, calcium channels mediate GABA release from fast-spiking interneurons to pyramidal cells in rat prefrontal cortex. *J Neurophysiol*. 97:3567–3573.

Zhang Z, Gadotti VM, Chen L, Souza IA, Stemkowski PL, Zamponi GW (2015) Role of prelimbic GABAergic circuits in sensory and emotional aspects of neuropathic pain. *Cell Rep*. 12:752–759.

Zhang Z, Séguéla P (2010) Metabotropic induction of persistent activity in layers II/III of anterior cingulate cortex. *Cereb Cortex*. 20:2948-57.

Zikopoulos B, Barbas H (2006) Prefrontal projections to the thalamic reticular nucleus form a unique circuit for attentional mechanisms. *J Neurosci*. 26(28):7348-61,

Zikopoulos B, Barbas H (2007) Circuits for multisensory integration and attentional modulation through the prefrontal cortex and the thalamic reticular nucleus in primates. *Nuerosci*. 18(6):417-438.

Zingg B, Hintiryan H, Gou L, Song MY, Bay M, Bienkowski MS, Foster NN, Yamashita S, Bowman I, Toga AW (2014) Neural networks of the mouse neocortex. *Cell*. 156:1096–1111.